

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLI BRUSCO MOREIRA

**INFECÇÕES POR VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR) NO PERÍODO DE
DOIS ANOS: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E IMPACTO CLÍNICO**

CURITIBA

2015

FRANCIELLI BRUSCO MOREIRA

**INFECÇÕES POR VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR) NO PERÍODO DE
DOIS ANOS: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E IMPACTO CLÍNICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Mara Raboni.

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Moreira, Francieli Brusco

Infecções por vírus sincicial respiratório (VSR) no período de dois anos: epidemiologia molecular e impacto clínico. / Francieli Brusco Moreira. – Curitiba, 2015.

115 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Sônia Mara Raboni

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Infecções por Vírus Respiratório Sincicial. 2. Epidemiologia molecular. 3. Genótipos. Título II. Raboni, Sônia Mara. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576.64



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**"INFECÇÕES POR VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR) NO
PERÍODO DE DOIS ANOS: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E
IMPACTO CLÍNICO"**

por

FRANCIELLI BRUSCO MOREIRA

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Profª. Drª. Sonia Mara Raboni – Presidente

Profª. Drª. Meri Bordignon Nogueira

Drª. Luine R.R. Vidal

Curitiba, 18 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve comigo, me guiando e me dando forças em todos os momentos difíceis. Agradeço por ter me proporcionado essa oportunidade de estudar e aprender mais um pouco e por colocar inúmeras pessoas maravilhosas e exemplares em meu caminho.

À Prof^a Dra. Sônia Mara Raboni, minha orientadora, pelo apoio, incentivo, oportunidade, confiança e principalmente pela paciência e dedicação para ensinar e ajudar na construção do nosso trabalho.

À Dra. Luine Rosele Renaud Vidal por unir-se a este desafio, contribuindo com seu conhecimento e experiência que foram de grande importância neste trabalho.

À Dra. Meri Bordignon Nogueira, pelas palavras de amizade, auxílios e pela disponibilidade do laboratório de virologia.

À Dra. Juliana Ferreira de Moura pelas palavras de incentivo e por ser exemplo como pesquisadora e professora.

À Dra. Andréa Emilia. M. Stinghen, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR pela compreensão, disponibilidade e pela dedicação a esse programa de pós-graduação.

À secretária Luciana Marques, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR, pela disposição e auxílio nos momentos de dúvidas.

Ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação, pela compreensão nos momentos difíceis.

À residente médica Cristine S. Rosário, por sua contribuição nas análises e dados dos prontuários clínicos.

À minha família e à minha nova família Ribeiro, por entenderem as minhas ausências, por todas as orações, pela paciência e pelo amor.

Ao meu querido noivo, Luiz César, companheiro durante essa caminhada, consolador nos momentos de angústia e apoio em todos os momentos.

Às amigas Carolina, Daiane, Dayane Coldibeli, Danieli, Helena, Heloísa, Izanara, Karina, Lauren, Letícia, Lilian, Talita e Patricia, minhas companheiras nos momentos de desespero, obrigada pelos momentos de descontração. À Jucélia,

Valéria, Magda, Luciane, Bruna, Suzana, Guilherme e Gislene pelo companheirismo e por compartilhar as dificuldades e desafios durante a pós-graduação.

Aos colegas de laboratório Bárbara, Clyete, Ednéia, Gisa, Indianara, Luciane, Noely e Sérgio pelo companheirismo e por toda a ajuda no laboratório.

Às estagiárias Elisa e Hanna pelas conversas e momentos de descontração.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Básica e do Hospital de Clínicas, por estarem sempre prontos e dispostos a cooperar.

Ao departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e ao técnico Valter pela disponibilidade na realização dos sequenciamentos das amostras.

Às crianças que foram a base desta pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na concretização desse sonho, que é mais uma etapa vencida!

Aos vírus, motivo de curiosidade e admiração que me torna apaixonada pelo mundo da ciência e que me inspiram em acreditar e continuar.

Não há nada como um sonho para criar o futuro.

Victor Hugo

*Ainda que eu tenha o dom da profecia e conheça todos os
mistérios da ciência... Se não tiver amor, nada sou.*

1 Cor 13, 2

RESUMO

Introdução: O vírus sincicial respiratório (VSR) é um importante agente etiológico de infecções respiratórias agudas, prevalente entre crianças com até dois anos de idade e geralmente associado à casos de bronquiolite e pneumonia. O VSR é um *paramyxovirus*, possui uma fita simples de RNA com 10 genes que codificam 11 proteínas, classifica-se em dois grupos, A e B. Um dos principais fatores que contribuem para as epidemias pelo VSR é a variabilidade genética das proteínas de superfície F e G, que são responsáveis pela adesão e entrada do vírus nas células hospedeiras. Este estudo relata o perfil da variabilidade genética, clínica e epidemiológica do VSR detectado em pacientes pediátricos internados em um hospital de ensino de alta complexidade, no Sul do Brasil. **Métodos:** Este é um estudo transversal que analisa amostras de pacientes pediátricos atendidos de julho de 2011 a maio de 2013. Dados clínicos, demográficos e epidemiológicos foram avaliados por revisão de prontuários clínicos. Amostras positivas para VSR foram analisadas por RT-PCR convencional para amplificação dos genes G e F e foram subtipadas por meio de sequenciamento nucleotídico. **Resultados:** Um total de 70 amostras positivas para VSR foram analisadas, sendo 55 (78,6%) do grupo A e 15 (21,4%) do grupo B. Quarenta e oito (68,6%) delas apresentaram monoinfecção e 22 (31,4%) coinfeção viral. A média de idade foi de 6 meses (IQR 2; 11), e 54,3% dos pacientes eram do sexo feminino. Onze pacientes apresentaram comorbidades entre a população estudada. Febre, esforço respiratório, necessidade de oxigênio e uso de antibiótico foram observados para a maioria dos pacientes. Nove crianças precisaram de cuidados intensivos e uma paciente faleceu devido a outros fatores não relacionados com a condição respiratória. Entre as amostras do grupo A, 27 (27/68, 39,7%) relacionaram-se com o genótipo ON1, que possui a inserção de 72 nucleotídeos na segunda região variável do gene G. Entretanto, todas as amostras do grupo B (15 amostras) relacionaram-se com o genótipo *BA-like*, que possui a inserção de 60 nucleotídeos na segunda região hipervariável da proteína G. Os genótipos encontrados na população estudada foram: ON1, NA1, NA2 e GA5 para o grupo A e *BA-like* para o grupo B. **Conclusão:** Não foi observada associação entre casos graves e a presença de mono ou coinfeção, nem em relação ao grupo do VSR. Porém quando são comparadas amostras pertencentes aos genótipos ON1 e *BA-like* que possuem inserção de nucleotídeos, com aquelas sem a inserção, observa-se uma diferença significativa com maior frequência de doença grave - definidos como aqueles casos que necessitam de ventilação mecânica invasiva, internamento em UTI e/ou óbito – entre os pacientes infectados com as variantes que apresentavam inserção de nucleotídeos. Estes achados contribuem para uma melhor compreensão sobre a dinâmica das infecções por VSR na população pediátrica e os fatores associados com a gravidade da doença.

Palavras-chave: Vírus sincicial respiratório humano. Epidemiologia molecular. Genótipos. Infecções respiratórias. Infecções por vírus respiratório sincicial.

ABSTRACT

Background: Human respiratory syncytial virus (hRSV) is a major etiologic agent of acute respiratory infections. It is highly prevalent among children until two years old, and usually associated with bronchiolitis and pneumonia. The hRSV, a *paramyxovirus*, has a single strand RNA with 10 genes, which codifies 11 proteins, and is classified into two groups, A and B. An important factor that contributes to hRSV outbreaks is the surface proteins F and G genetic variability, which are responsible for entry and dissemination of the virus in the host cells. This study reports genetic variability, clinical and epidemiological profile of hRSV detected in pediatric patients admitted to a highly complex teaching hospital, in Southern Brazil. **Methods:** This cross-sectional study included samples from pediatric patients attending from July 2011 to May 2013. Clinical, demographic, and epidemiological data were evaluated by review of medical records. hRSV positive samples were analyzed by conventional RT-PCR to amplify the G and F genes, and subtyping was carried out by nucleotide sequencing. **Results:** A total of 70 hRSV positive were analyzed, being 55 (78.6%) type A and 15 (21.4%) type B. Forty-eight (68.6%) of them presented viral mono-infection, and 22 (31.4%) viral co-infection. The median age was 6 months (IQR 2; 11), and 54.3% of patients were female. Eleven patients had co-morbidities among the study population. Fever, respiratory distress, oxygen therapy and antibiotic use were reported for the majority of patients. Nine children needed intensive care, and one patient died due to other factors unrelated to the respiratory condition. Among the samples of group A, 27 (27/68, 39.7%) correlated with the genotype ON1, which has the 72 nucleotide insertion in the second variable region gene G. However, all samples of group B (15 samples) were related to the BA-like genotype, which has the 60 nucleotides insertion in the second hypervariable region of the G protein. The genotypes found in this study were: ON1, NA1, NA2 and GA5 for group A and BA-like for group B. **Conclusion:** There was no association between severe cases and the presence of mono- or coinfection, even compared to the group of hRSV. However, the comparison between samples belonging to genotypes ON1 and BA-like insertion having nucleotide sequences and those without the insertion, showed a significant difference with presence of severe disease - defined as those cases that require invasive mechanical ventilation, hospitalization in ICU and/ or death - among patients infected with viral variants presenting nucleotides insertion. These findings provide new information about the molecular epidemiology of circulating hRSV among hospitalized pediatric patients, which contributes to a better understanding of the factors associated with the severity of this disease among these patients.

Key words: Human respiratory syncytial virus. Molecular epidemiology. Genotype. Respiratory tract infections. Respiratory syncytial virus infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - TAXONOMIA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO	23
FIGURA 2 - ESTRUTURA E ESQUEMA DO GENOMA DO VSR.....	24
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO VSR E COMPLEXO DA RIBONUCLEOPROTEÍNA.	24
FIGURA 4 - MAPA GENÉTICO DO VSR	26
FIGURA 5 - ELETROMICROGRAFIA DA PARTÍCULA VIRAL DO VSR NA MEMBRANA DA CÉLULA HOSPEDEIRA	28
FIGURA 6- ETAPAS QUE FORAM DESENVOLVIDAS PARA A REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	52
FIGURA 7 - MODELOS DE AMPLIFICAÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS UTILIZANDO O KIT DE AMPLIFICAÇÃO <i>SEEPLEX®</i> RV15 <i>ACE</i> <i>DETECTION</i> (SEEGENE INC, KOREA)	56
FIGURA 8 - BANDAS OBTIDAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM PRODUTOS DA RT- PCR <i>MULTIPLEX</i>	60
FIGURA 9 - FÓRMULA RECOMENDADA POR TAGUCHI	61
FIGURA 10 - IMAGEM DO GEL DE ELETROFORESE UTILIZADO PARA PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR USANDO A METODOLOGIA DE TAGUCHI	62
FIGURA 11 - ORGANIZAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA VIRAL DO VSR	64
FIGURA 12 - FLUXO DE TRABALHO E RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA VSR	72
FIGURA 13 - INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS POR VSR DE ACORDO COM OS MESES DO ANO (N=70 AMOSTRAS)	74
FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DAS INFECÇÕES POR VSR COM E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO PERÍODO DE JULHO DE 2011 A MAIO DE 2013 (N= 68 AMOSTRAS).....	83
FIGURA 15 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM AMOSTRAS DO VSR GRUPO A (GENE G) USANDO O MÉTODO DE <i>MAXIMUM LIKELIHOOD</i>	85
FIGURA 16 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM AMOSTRAS DO VSR GRUPO B (GENE G) USANDO O MÉTODO DE <i>MAXIMUM LIKELIHOOD</i>	86

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR GRUPO A	33
QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR DO GRUPO B	34
QUADRO 3 – RELAÇÃO DO TIPO VIRAL DE CADA CONJUNTO PESQUISADO (A, B E C) E DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR MEIO DA METODOLOGIA UTILIZANDO O KIT RV15 <i>ACE</i> <i>DETECTION</i>	55
QUADRO 4- VARIÁVEIS UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE TAGUCHI	58
QUADRO 5 - MATRIZ ORTOGONAL SUGERIDA PELA METODOLOGIA DE TAGUCHI, PARA CORRELACIONAR OS PARÂMETROS COM 12 POSSIBILIDADES DE TESTES.....	59
QUADRO 6 - MATRIZ ORTOGONAL OBTIDA APÓS O CRUZAMENTO DAS VARIÁVEIS E SUAS POSSIBILIDADES DE ENSAIO	59
QUADRO 7- MELHORES PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RT-PCR E <i>SEMI-NESTED</i> PCR, DE ACORDO COM O RESULTADO DA PADRONIZAÇÃO PELA METODOLOGIA DE TAGUCHI	63
QUADRO 8- RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA TÉCNICA DE RT-PCR, MOSTRANDO SUA ESPECIFICIDADE PARA O GRUPO A E/OU GRUPO B, POLARIDADE, LOCALIZAÇÃO, SEQUÊNCIA E TAMANHO DO PRODUTO ESPERADO.	64
QUADRO 9 - REFERÊNCIAS DO GRUPO A DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	68
QUADRO 10 - REFERÊNCIAS DO GRUPO B DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IMPACTO DA COINFECÇÃO VIRAL NA GRAVIDADE CLÍNICA DA DOENÇA EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM DOENÇAS RESPIRATÓRIAS	46
TABELA 2 - QUANTIDADE DE DNA MOLDE A SER UTILIZADO EM REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO, DE ACORDO COM O TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO.....	67
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS NOS CASOS DE INFECÇÃO PELO VSR DO GRUPO A E VSR DO GRUPO B	75
TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE INFECÇÃO PELO VSR DO GRUPO A E VSR DO GRUPO B	76
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFECÇÃO COM O VSR	77
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFECÇÃO COM O VSR.....	78
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS	80
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO.....	81

LISTA DE SIGLAS

ANF	- Aspirado nasofaríngeo
BAL	- “ <i>Bronchoalveolar lavage</i> ” (lavado bronco alveolar)
CCA	- “ <i>Chimpanzee Coryza Agent</i> ” (Agente da Coriza do Chimpanzé)
cDNA	- DNA complementar
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
ddNTP	- Didesoxinucleotídeo trifosfato
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
DPO	- “ <i>Dual Priming Oligonucleotide</i> ” (<i>Primers</i> Oligonucleotídeos Duplos)
ECP	- Efeito citopático
EUA	- Estados Unidos da América
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IF	- Imunofluorescência
IFD	- Imunofluorescência direta
IFI	- Imunofluorescência indireta
IgG	- Imunoglobulina da classe G
IQR	- “ <i>Interquartile range</i> ” (Intervalo – interquartil)
IRA	- Infecção respiratória aguda
ITR	- Infecções do trato respiratório
ITRI	- Infecções do trato respiratório inferior
MAbs	- Anticorpos monoclonais
MEGA	- <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
NA	- Não aplicável
NI	- Não informado
nt	- Nucleotídeos
ORF	- “ <i>Open reading frame</i> ” (região aberta de leitura)
PCR	- “ <i>Polymerase chain reaction</i> ” (reação em cadeia da polimerase)
q.s.p	- Quantidade suficiente para
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	- Ribonuclease

RNP	- Ribonucleoprotéico
RpRd	- Enzima RNA polimerase RNA dependente
RT	- Transcriptase reversa
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
TNF- α	- Fator de necrose tumoral – alfa
UTI	- Unidade de terapia intensiva
UV	- Luz ultravioleta
VR	- Vírus respiratórios

LISTA DE ABREVIATURAS DE LINHAGENS CELULARES

- A549 - Derivada de carcinoma de pulmão humano
- HeLa - Derivada de carcinoma epitelial de cérvix humano
- HEp-2 - Derivada de carcinoma de laringe humana
- NCI-H92 - Derivada de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano

LISTA DE ABREVIATURAS DOS VÍRUS

AdV	- adenovírus
CoV	- coronavirus humano 229E/ NL63/ OC43/ HKUI1
Flu A	- influenza A
Flu B	- influenza B
HBoV	- bocavírus humano
HEV	- enterovirus humano
HPeV	- parechovirus humano
HRV	- rinovirus humano
hMPV	- metapneumovírus humano
PIV1	- vírus parainfluenza do tipo 1
PIV2	- vírus parainfluenza do tipo 2
PIV3	- vírus parainfluenza do tipo 3
PIV4	- vírus parainfluenza do tipo 4
VSR	- vírus sincicial respiratório
VSR A	- vírus sincicial respiratório do grupo A
VSR B	- vírus sincicial respiratório do grupo B

LISTA DE ABREVIATURAS DAS PROTEÍNAS VIRAIS DO VSR

F	- Proteína de fusão
G	- Proteína de adesão
L	- Proteína polimerase (" <i>large protein</i> ")
M	- Proteína de matriz
N	- Nucleoproteína
NS1	- Proteína não-estrutural NS1
NS2	- Proteína não-estrutural NS2
P	- Fosfoproteína
SH	- Pequena proteína transmembrana (" <i>Small hydrophobic protein</i> ")

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Porcentagem
°C	- Graus Celsius
µL	- Microlitro (10^{-6} litro)
bp	- Pares de bases
M	- Molar
mL	- Mililitro (10^{-3} litro)
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetros
pH	- Potencial hidrogeniônico
PM	- Peso molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1	VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO – HISTÓRICO	21
4.2	ASPECTOS VIROLÓGICOS	22
4.2.1	Classificação	22
4.2.2	Estrutura	23
4.2.3	Estrutura Genômica.....	25
4.3	CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS.....	27
4.4	CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA.....	29
4.5	VARIABILIDADE GENÉTICA	31
4.6	TRANSMISSÃO E PRECAUÇÕES	36
4.7	EPIDEMIOLOGIA	37
4.8	ASPECTOS CLÍNICOS	39
4.9	TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	41
4.10	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	42
4.10.1	Isolamento viral.....	43
4.10.2	Imunofluorescência (IF)	43
4.10.3	RT-PCR	43
4.11	COINFECÇÃO VIRAL	44
4.12	MÉTODO TAGUCHI.....	47
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5.1	TIPO DE ESTUDO	49
5.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	49
5.3	MATERIAL.....	49
5.3.1	Critérios de elegibilidade	49
5.3.1.1	Critérios de inclusão	49
5.3.1.2	Critérios de exclusão	50
5.3.2	Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.....	50

5.3.2.1	Demográficos	50
5.3.2.2	Epidemiológicos.....	50
5.3.2.3	Clínicos	50
5.3.2.4	Laboratoriais	51
5.4	MÉTODOS	52
5.4.1	Processamento das amostras	52
5.4.2	Extração do genoma viral	53
5.4.3	Síntese do DNA complementar	54
5.4.4	Detecção e tipagem de VSR em amostras respiratórias	54
5.4.4.1	RT-PCR <i>multiplex</i>	54
5.4.5	Subtipagem de VSR – Amplificação parcial dos genes G e F.....	58
5.4.5.1	RT- PCR <i>semi-nested</i> utilizando o método de Taguchi	58
5.4.5.2	RT- PCR <i>duplex</i> adaptado.....	63
5.4.5.3	Eletroforese em gel de agarose.....	65
5.4.6	Purificação dos produtos amplificados	65
5.4.7	Reação de sequenciamento para marcação do DNA.....	66
5.4.8	Purificação e precipitação do DNA marcado	67
5.4.9	Análise filogenética.....	68
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
6	RESULTADOS	71
6.1	DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS	71
6.2	DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS	73
6.3	SAZONALIDADE	74
6.4	COMPARAÇÕES ENTRE PACIENTES INFECTADOS PELO VSR GRUPO A E GRUPO B	75
6.5	COMPARAÇÕES ENTRE PACIENTES MONO E COINFECTADOS PELO VSR	77
6.6	COMPARAÇÕES ENTRE AMOSTRAS COM INSERÇÃO E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS.....	80
6.7	RT-PCR CONVENCIONAL <i>DUPLEX</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS G E F E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	83
6.8	ANÁLISE FILOGENÉTICA	83
7	DISCUSSÃO	87

8	CONCLUSÕES	95
9	PERSPECTIVAS	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE 1 - PROTOCOLO DA RT-PCR <i>SEMI-NESTED</i> PARA VSR	108
	APÊNDICE 2 - DADOS CLÍNICOS ANALISADOS POR REVISÃO DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS INCLUÍDOS NO ESTUDO	109
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP-HC-UFPR	110
	ANEXO 2 – MEIO DE TRANSPORTE PARA VÍRUS RESPIRATÓRIOS	112
	PRODUÇÃO ACADÊMICA 1 - RESUMO APRESENTADO NA 2ª MOSTRA ANUAL DE PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS “ <i>CIÊNCIA NO ESPELHO</i> ”	113
	PRODUÇÃO ACADÊMICA 2 - RESUMO PUBLICADO: VIRUS REVIEWS AND RESEARCH – JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY.....	114

1 INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias virais representam um importante problema de saúde pública pela sua ocorrência mundial, facilidade de disseminação na comunidade e relativa morbidade e mortalidade (FARIA, 2012).

Em pacientes pediátricos, as infecções por vírus respiratórios (VR) são as principais causas de morbidade, necessitando hospitalização, resultando em altos gastos para a família e a sociedade (QUAN *et al.*, 2007; LAMBERT *et al.*, 2008). Estas infecções são responsáveis por 1 a 3% da mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade em países industrializados e de 10 a 15% em países em desenvolvimento (QUAN *et al.*, 2007). Estima-se que anualmente morrem aproximadamente 5 milhões de crianças por infecções respiratórias de origem viral (FARIA, 2012).

Os agentes etiológicos virais mais frequentes envolvidos com as infecções do trato respiratório (ITR) são: vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza tipo A (Flu A), influenza tipo B (Flu B), adenovírus (AdV) e vírus parainfluenza (PIV) tipos 1, 2, 3 e 4. Esses vírus são responsáveis por diversas manifestações clínicas que incluem elevado comprometimento do trato respiratório inferior (SYRMIS *et al.*, 2004). Recentemente, outros agentes etiológicos associados com infecção respiratória aguda (IRA), como o metapneumovirus humano (hMPV) tipo A e B (RAMIREZ *et al.*, 2014), o coronavírus humano OC43 e HKU1 (CoV), o bocavírus humano (HBoV), o KI poliomavírus (KIPyV ou KIV)¹ e WU poliomavírus (WUPyV ou WUV)² e o parechovirus humano (HPeV) foram descritos (COYLE *et al.*, 2004).

Muitos estudos relatam que o VSR é o principal patógeno causador de doenças do trato respiratório inferior durante a infância, principalmente em menores de dois anos de idade (CRUZ, 1998; FALSEY; WALSH, 2000; COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011) e um importante agente viral em pacientes imunocomprometidos e idosos (CANE, 2001; REIS, 2006; PIEDIMONTE; PEREZ, 2014; TAPIA *et al.*, 2014; NOLAN *et al.*, 2015). Paris (2012) comenta em

¹ KIPyV ou KIV – Nomenclatura proposta por Allander *et al.* (2007) para KI *polyomavirus*, considerado o terceiro Polyomavirus Humano.

² WUPyV ou WUV – Descrito por Gaynor *et al.* (2007), que detectaram a presença de um DNA apresentando similaridade com os outros tipos já descritos de poliomavírus, em amostras de ANF.

sua dissertação que dados americanos do final da década de 90 estimavam 100.000 hospitalizações e 4.500 mortes relacionadas ao VSR anualmente, o que geraria um gasto superior a 300 milhões de dólares por ano.

Esse agente patogênico é peculiar entre os que causam doenças respiratórias, não só por causar sérios problemas de saúde a crianças, mas devido às suas proteínas estruturais que possuem características de alta variabilidade genética, como no caso das proteínas glicosiladas de superfície G e F, sendo a G com as maiores taxas de modificação (TAPIA *et al.*, 2014).

A investigação das infecções causadas pelo VSR pode fornecer informações sobre a evolução e a variação genética apresentada por este vírus no decorrer dos anos, facilitando assim, o entendimento das respostas imunológicas apresentadas e justificando o fato de ocorrerem reinfecções. Embora já esteja estabelecido que a infecção primária pelo VSR desencadeia uma resposta imune fraca, existem poucos dados em relação a novas infecções nestes pacientes, assim como o estudo de reinfecções em crianças imunodeprimidas, sendo outra questão importante para a qual há pouca informação disponível (ARBIZA *et al.*, 2006).

Dada à relevância desse vírus entre as infecções respiratórias da infância, conhecer a dinâmica da distribuição dos genótipos virais durante distintos períodos de circulação e avaliar o seu impacto clínico agregará novos elementos que possibilitarão o desenvolvimento de pesquisas, visando o avanço de estratégias para o controle desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a epidemiologia molecular do VSR em pacientes pediátricos hospitalizados com infecções respiratórias no período de julho de 2011 a maio de 2013.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de RT-PCR convencional para amplificação dos genes que codificam as proteínas G e F do VSR, utilizando a metodologia de Taguchi;
- Avaliar o impacto das infecções por VSR em pacientes hospitalizados com infecções respiratórias, comparando os dados clínicos e laboratoriais com os diferentes genótipos detectados;
- Comparar as características genotípicas do VSR detectados em mono e coinfeções;
- Verificar os genótipos predominantes entre as amostras em estudo e correlacionar com o padrão de circulação viral nas diferentes regiões do Brasil e do mundo, conforme descrito na literatura.

3 JUSTIFICATIVA

O VSR apresenta uma importante incidência na população pediátrica atendida no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), onde anualmente observa-se significativa circulação desse agente viral. Diversos estudos relatam uma alta frequência de modificações genéticas em suas proteínas externas, principalmente a glicoproteína G, sendo provavelmente um dos fatores responsáveis pela manutenção da circulação destes patógenos na população pediátrica, além de apresentar uma potencial associação com maior gravidade em alguns anos. A implantação de metodologias que diferenciem os tipos e genótipos de VSR permitirá conhecer a epidemiologia molecular destes vírus identificados nesta instituição, além de avaliar seu impacto na saúde da população pediátrica ali atendida.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO – HISTÓRICO

O VSR foi isolado pela primeira vez por Morris, Blount e Savage (1956) em um chimpanzé de laboratório, que durante uma epidemia apresentou sintomas de doença respiratória. A epidemia aconteceu em outubro de 1955, no *Walter Reed Army Institute of Research*, Washington, D.C. (EUA), em 20 chimpanzés saudáveis que tinham entre 15 a 20 meses de idade. Os sintomas respiratórios da doença caracterizavam-se por tosse, espirros e secreção nasal purulenta (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956).

A amostra coletada de um desses chimpanzés doentes foi inoculada em cultura de células hepáticas causando alterações (arredondamento, granulação, desprendimento das células da parede do tubo) e morte celular após oito dias da inoculação (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956). O material isolado foi inoculado em diversos animais de laboratório, como ratos, hamsters, coelhos, porquinhos-da-índia e ovos embrionados, porém somente os primatas desenvolveram os sinais da doença (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956; CHANOCK; FINBERG, 1957a). Inicialmente (CHANOCK; ROIZMAN; MYERS, 1957b) esse vírus foi chamado de *Chimpanzee Coryza Agent* (CCA).

No ano seguinte, um vírus semelhante foi isolado em duas crianças, uma com pneumonia e outra com laringotraqueobronquite, em Baltimore, no estado de Maryland (EUA), quando foi observada sua característica em produzir sincícios em cultivo celular, resultante da fusão de células infectadas, formando assim, uma célula multinucleada. Após este episódio, o nome *Chimpanzee Coryza Agent* foi substituído e deu-se ao vírus a presente designação “vírus sincicial respiratório”, por refletir afinidade pelo trato respiratório e por sua habilidade em formar sincícios (CHANOCK; FINBERG, 1957a; CHANOCK; ROIZMAN; MYERS, 1957b).

Estudos sorológicos realizados na época indicaram que a maioria das crianças em Baltimore já havia sido infectada com VSR antes dos quatro anos de idade (CHANOCK *et al.*, 1962). Outros estudos realizados em várias partes do mundo mostraram que o VSR estava associado com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite. Posteriormente foi evidenciado que o VSR era o principal patógeno de doenças do trato respiratório inferior durante a infância,

porém também podia infectar e causar doença em indivíduos de todas as idades, levando à doença respiratória severa em idosos e imunocomprometidos (FALSEY; WALSH, 2000; COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007; PARIS, 2012; NOLAN *et al.*, 2015).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez por Candeias em 1964 (CANDEIAS, 1967). Foram estudadas 24 crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo. Desse total, o VSR foi isolado em quatro amostras, uma criança com broncopneumonia e desnutrição, de três meses de idade; duas com broncopneumonia e bronquiolite, com três dias e três meses de idade, respectivamente; e uma com broncopneumonia, com 45 dias de idade. A confirmação do isolamento em cultura de células foi feita por prova de neutralização, utilizando um soro padrão (CANDEIAS, 1967).

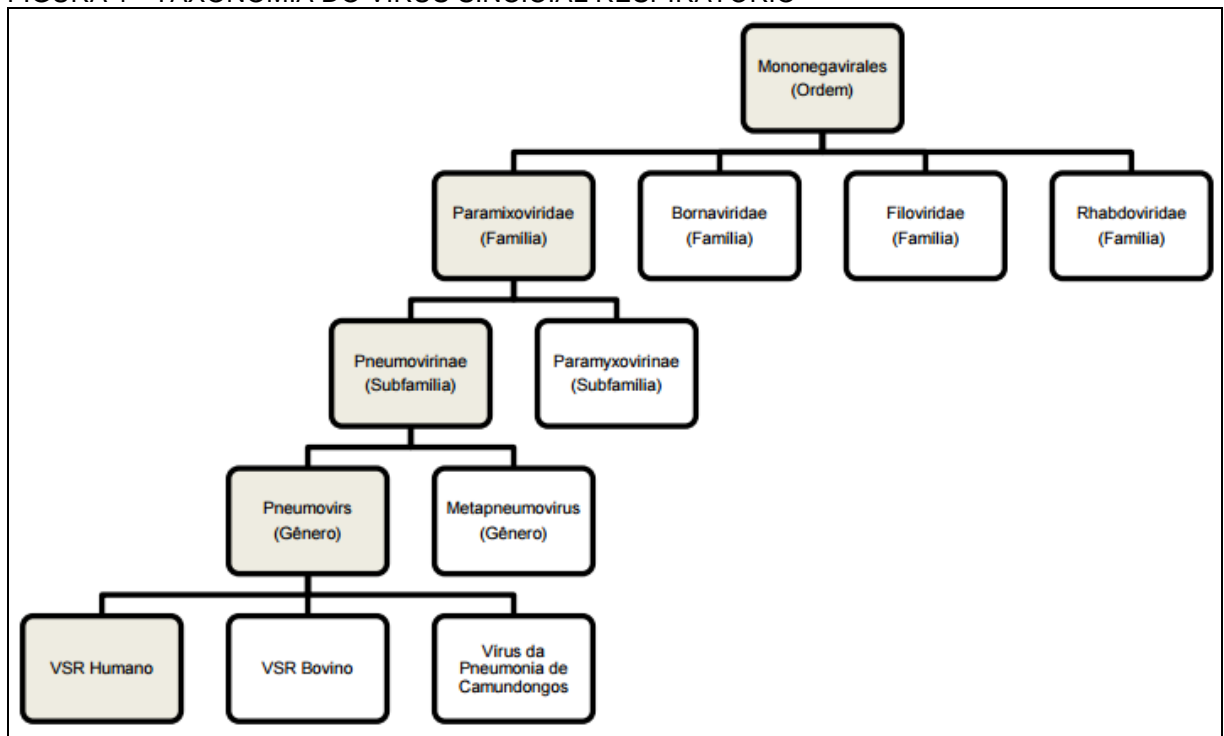
4.2 ASPECTOS VIROLÓGICOS

4.2.1 Classificação

Com base em sua morfologia, o VSR é membro da Ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, sub-família *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*, o qual também engloba o vírus sincicial respiratório bovino e o vírus da pneumonia de camundongos (ICTV, 2006; COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007; HOWLEY, 2007), sugerindo que pode ter acontecido mudanças de hospedeiros entre essas espécies durante a evolução desse vírus (FIGURA 1). O VSR constitui espécie-tipo³ dentro do gênero *Pneumovirus* (REIS, 2006).

³ Espécie-tipo: espécie cujas características são fixadas como padrão para um gênero. Fonte: DICIONÁRIO DA LÍNGUA PORTUGUESA, 2003 -2015.

FIGURA 1 - TAXONOMIA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO



FONTE: MACHADO (2012).

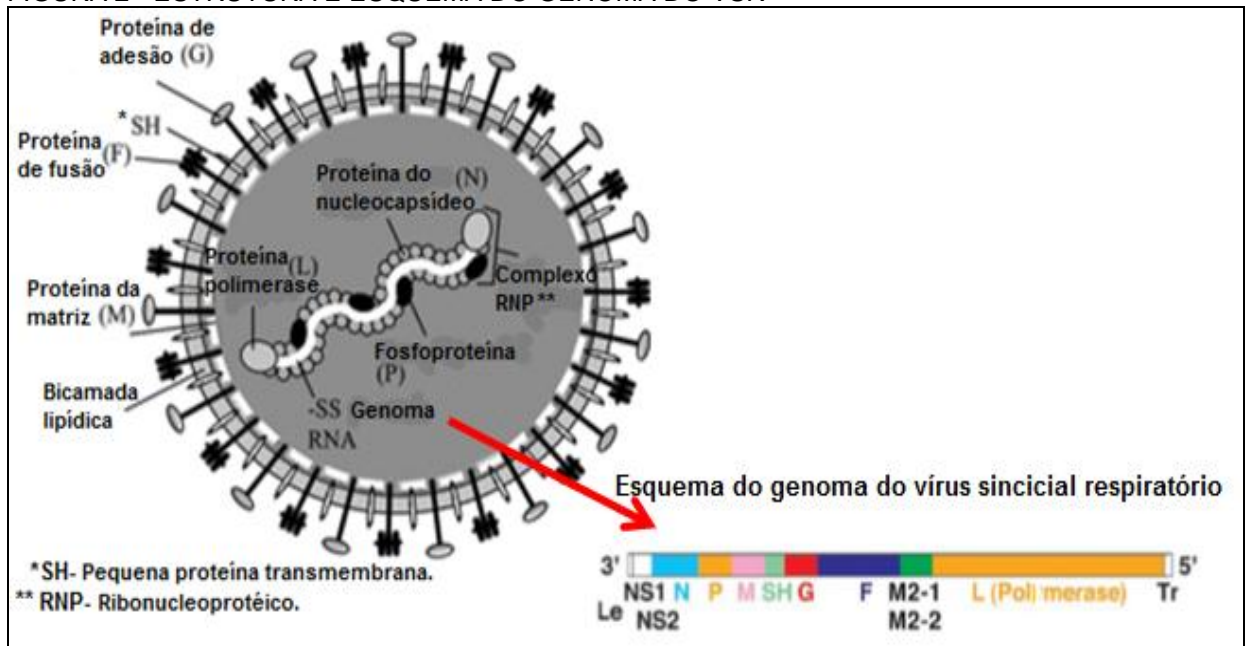
O VSR é lábil, sendo sensível a extremos de temperatura e pH, bem como a detergentes. A 55°C é rapidamente destruído e a 37°C por 24h, somente 10% de sua infectividade permanece. Após armazenamento a 4°C por uma semana, apenas 1% de sua infectividade é preservada (WALSH; HALL, 1989; HOWLEY, 2007).

4.2.2 Estrutura

O VSR apresenta estrutura pleomórfica, com morfologia esférica irregular, podendo também apresentar-se com formas filamentosas longas (NORRBY; MARUSYK; ORVELL, 1970), possuindo envelope. Os VSR humano e animal pertencem ao mesmo gênero e família (FIGURA 1), mas são espécies diferentes (WALSH; HALL, 1989; HOWLEY, 2007). À semelhança de outros membros da família *Paramyxoviridae*, esse vírus é composto por um invólucro que envolve um nucleocapsídeo helicoidal que contém o RNA linear de cadeia simples, de polaridade negativa, não segmentado, com 15.222 nucleotídeos (NASCIMENTO, 2006), que codificam 11 proteínas, pesando aproximadamente 5×10^6 daltons (HUANG; WERTZ, 1982).

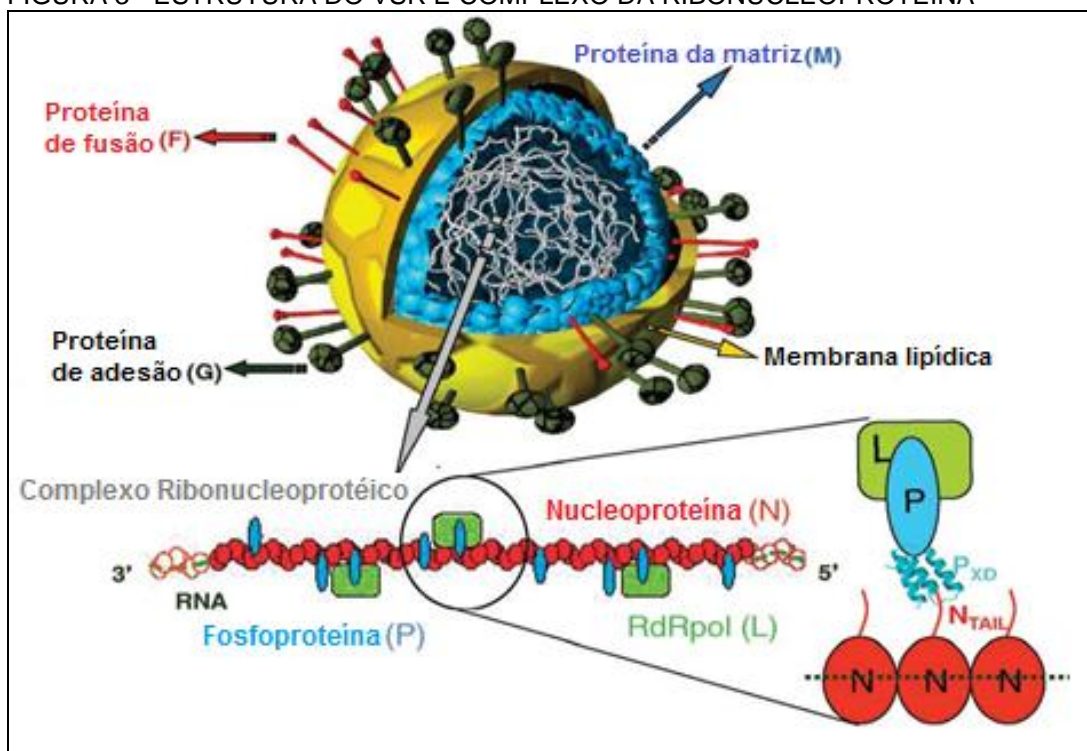
Na FIGURA 2 observam-se as representações da estrutura com suas proteínas identificadas e o genoma do VSR, com os genes destacados por cores diferentes. A representação esquemática da estrutura e do complexo da ribonucleoproteína do VSR pode ser visualizada na FIGURA 3.

FIGURA 2 - ESTRUTURA E ESQUEMA DO GENOMA DO VSR



FONTE: Modificado de FARIA (2012).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DO VSR E COMPLEXO DA RIBONUCLEOPROTEÍNA



FONTE: Modificado de HABCHI; LONGHI (2011).

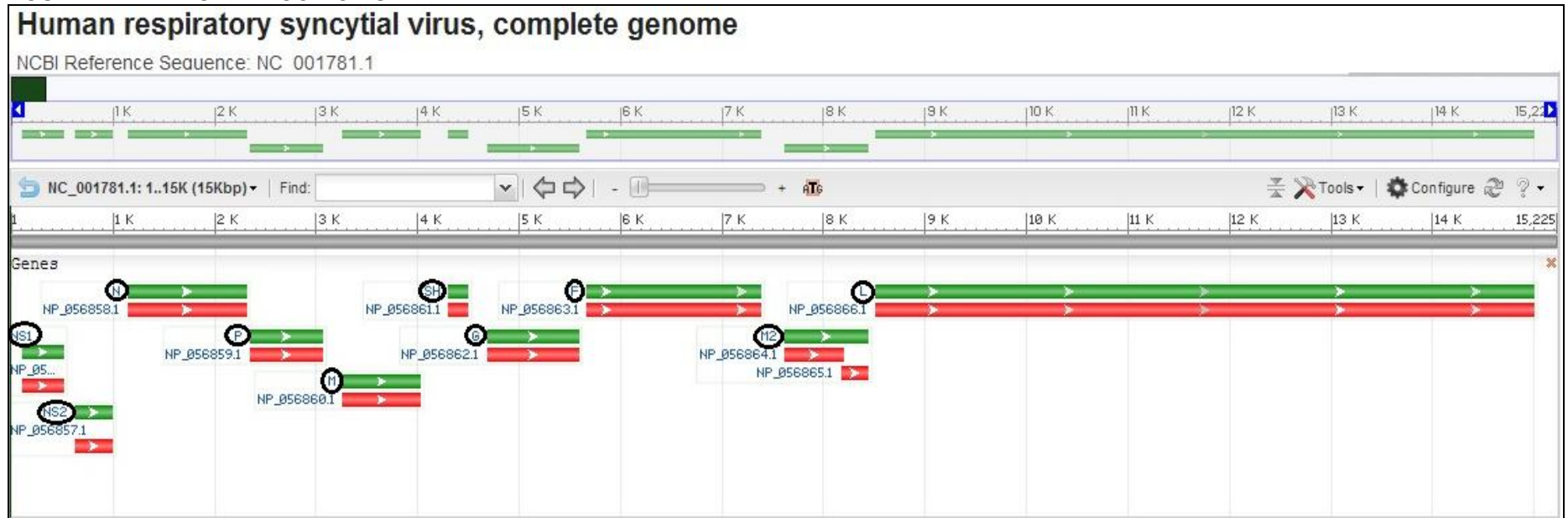
O vírion possui diâmetro variável entre 12 e 15 nanômetros (nm) e sua estrutura final envelopada apresenta entre 150 a 300 nm (COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007).

4.2.3 Estrutura Genômica

O VSR possui 10 RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos. Cada um possui uma ORF (*Open reading frame*), exceto o M2, o qual possui duas ORF, que codificam as proteínas M2-1 e M2-2 (REIS, 2006).

A porção 3' do RNA genômico consiste de uma região extragênica de 44 nucleotídeos (região *leader*). Esta região é seguida por 10 genes na seguinte ordem: 3' **NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 e L** 5', representados na FIGURA 4, onde as proteínas estão destacadas em vermelho e os genes em verde. O gene L é seguido de uma região extragênica de 155 nucleotídeos, que é mais tolerante à inserção ou deleção de nucleotídeos.

FIGURA 4 - MAPA GENÉTICO DO VSR



FONTE: Adaptado do NCBI (2014).

NOTA: Função das proteínas apresentadas na figura foram retiradas de ELANGO *et al.* (1986); COLLINS; CROWE JÚNIOR (2007).

LEGENDA: **NS1** e **NS2** – antagonizar o interferon;

N e **P** – cofatores da enzima RNA polimerase;

M – auxilia na penetração e inibe a transcrição da célula;

SH – auxilia na fusão e inibe o TNF- α ;

G – responsável pela adesão à célula;

F – responsável pela fusão à célula;

M2 – regulatória e propagação viral;

L – maior subunidade da enzima RNA polimerase.

O VSR apresenta as proteínas não estruturais, designadas NS1 e NS2, e as estruturais, das quais três são proteínas de superfície transmembrana (F, G, SH), sendo a F e a G as mais antigênicas e que normalmente são escolhidas para os estudos de ensaios de vacinas e/ou desenvolvimento de novas drogas antivirais (ELANGO *et al.*, 1986; WERTZ *et al.*, 1987).

Duas outras proteínas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por M e M2-1, três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P e L), como visto na FIGURA 3, e uma é regulatória (M2-2) (FALSEY; WALSH, 2000; COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007).

Uma das funções das proteínas não estruturais NS1 e NS2 consiste em antagonizar as respostas antivirais induzidas pelo *interferon*. Já as proteínas estruturais de superfície F, G e SH, desempenham os seguintes papéis: a glicoproteína G, é responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira, a glicoproteína F auxilia na fusão e penetração do vírion na célula e promove a fusão de células hospedeiras infectadas para facilitar a transmissão célula a célula, formando sincícios; e a proteína SH (pequena hidrofóbica) ainda não apresenta função esclarecida, acredita-se que auxilia na fusão e inibe o fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α). A proteína da matriz, proteína M, auxilia a penetração viral e inibe a transcrição da célula hospedeira, e a proteína M2-1 promove a propagação viral. Finalmente as proteínas associadas ao RNA, proteínas N e P atuam como cofatores da enzima RNA polimerase RNA dependente (RpRd) e a proteína L é a principal e maior subunidade dessa enzima (FARIA, 2012; MACHADO 2012).

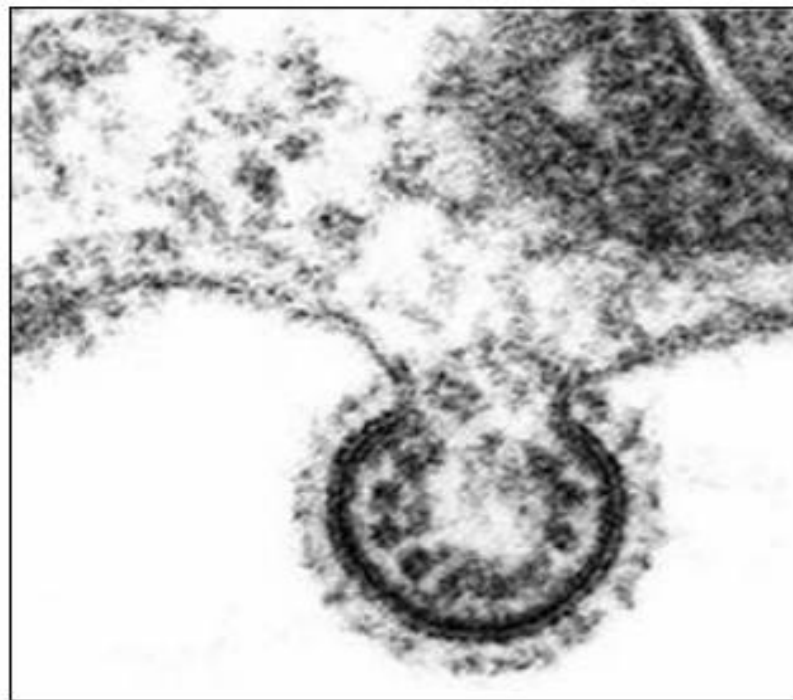
4.3 CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS

A adsorção do vírus à célula é mediada pela ligação da glicoproteína G a receptores celulares como o “*heparan sulfate-like moieties (proteoglycans)*”⁴ na superfície apical das células epiteliais (TAPIA *et al.*, 2014). Após a adesão, a glicoproteína F promove a fusão do invólucro viral à membrana celular da célula

⁴ *Heparan sulfate-like moieties (proteoglycans)* ou proteoglicanos de heparam sulfato: são encontrados na superfície celular e na matriz extracelular em todas as espécies animais. Possuem papel na sinalização celular levando à fosforilação de diversas proteínas citosólicas, culminando na regulação gênica. Fonte: DREYFUSS *et al.*, 2009.

hospedeira, este processo promove a introdução do nucleocapsídeo viral ao citoplasma. A replicação inicia-se com a transcrição do genoma viral pela polimerase e a montagem do nucleocapsídeo acontece no citoplasma, em etapas distintas. No início, ocorre uma associação da proteína N ao genoma, formando-se o complexo ribonucleoprotéico (RNP), subsequentemente as proteínas P e L associam-se ao complexo formando o nucleocapsídeo. A proteína M direciona o nucleocapsídeo às regiões da membrana celular que alcançam a superfície viral, para que o vírus adquira o invólucro proteico na superfície da célula hospedeira. Após esse processo, a partícula viral é liberada para o meio externo, fenômeno conhecido como “brotamento”, como observado na FIGURA 5 (FARIA, 2012).

FIGURA 5 - ELETROMICROGRAFIA DA PARTÍCULA VIRAL DO VSR NA MEMBRANA DA CÉLULA HOSPEDEIRA



FONTE: LAMARÃO (2011).

In vitro, o VSR replica-se numa variedade de células, como A549 (carcinoma de pulmão humano), HEP2 (carcinoma epitelial de laringe humana), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) (REIS, 2006), no entanto, em seres humanos a replicação parece estar restrita às células epiteliais respiratórias, porém antígenos virais podem ser encontrados em células ciliadas e também na submucosa (FARIA, 2012).

4.4 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA

Além de atuarem no ciclo replicativo viral, as proteínas N, F e G, possuem características genéticas e antigênicas particulares que distinguem vários genótipos de VSR (MARTINELLO *et al.*, 2002).

Por não apresentar um genoma segmentado, este vírus não tem a mesma capacidade de recombinação dos segmentos genômicos que o vírus influenza, no qual ocorrem os *shifts* antigênicos, responsáveis pelas pandemias. Contudo, como todos os vírus de genoma RNA, o VSR tem a capacidade de fazer pequenas mutações genômicas, devido à impossibilidade da RNA polimerase realizar correção e edição da fita replicada (COLLINS; CROWE JÚNIOR, 2007).

Coates, Kendrick e Chanock (1963), foram os primeiros a observar as diferenças antigênicas do VSR entre duas amostras analisadas, identificadas como A-1 (isolada em Melbourne, Austrália, em 1961) e *Long*. Em um estudo seguinte, Coates, Alling e Chanock (1966) observaram diferenças antigênicas entre outras amostras virais, *Long* e CH18537.

A cepa *Long* foi isolada em Baltimore, em 1956 de uma criança com pneumonia, enquanto a cepa CH18537 foi isolada em 1962 de uma criança com doença do trato respiratório superior. Ambos os estudos usaram a reação de neutralização com soro de animal hiperimune (coelhos ou cobaias). Nestes estudos demonstrou-se que a amostra A-1 não era neutralizada pelo soro preparado com a amostra *Long* ou CH18537 (COATES; KENDRICK; CHANOCK, 1963), sugerindo assim, que diferentes variantes poderiam estar circulando simultaneamente na mesma população (REIS, 2006).

Com o surgimento dos anticorpos monoclonais (MAbs) essas diferenças antigênicas mostraram-se mais definidas (GIMENEZ; CASH; MELVIN, 1984; ANDERSON *et al.*, 1985). Esta variabilidade antigênica pode ser visualizada pelas diferenças de títulos de anticorpos neutralizantes, mostrando serem mais específicos.

Levando-se em consideração a reatividade com um painel de MAbs, dividiu-se o VSR em dois grupos antigênicos A e B ou 1 e 2 (ANDERSON *et al.*, 1985; FARIA, 2012), tendo como referência para o grupo A, as cepas A2 e *Long* e para o grupo B, CH18537 (ANDERSON *et al.*, 1985; MUFSON *et al.*, 1985) e Sw8/60 (SULLENDER, 2000; PERDIGÃO, 2009).

Estudos prévios mostraram que o dimorfismo antigênico entre os grupos A e B é maior na glicoproteína G, apresentando em torno de 50% de variabilidade entre os aminoácidos (MACHADO, 2012), conferindo vantagem para o vírus em termos de evasão da resposta imune pré-existente (REIS, 2006).

O padrão de circulação dos tipos A e B aparece com grande variação entre regiões e anos distintos. Vários estudos demonstram que os dois tipos têm circulado concomitantemente em muitas epidemias em diversas regiões do mundo, com predominância de um deles (MUFSON, 1987; HENDRY; PIERIK; MCINTOSH, 1989; REIS, 2006; SIMABUCO, 2008).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos em países do hemisfério norte mostraram que as infecções pelo subtipo A são mais graves e ocorrem mais frequentemente, embora possam circular juntas durante a época epidêmica. Também observaram a circulação de múltiplos genótipos dentro de cada subtipo com substituição do genótipo dominante a cada ano (CRUZ, 1998; FARIA, 2012).

Embora a variação antigênica não seja essencial para a ocorrência de reinfecções, pode contribuir para que isso aconteça, uma vez que permite a evasão imune. Sabe-se que uma infecção primária apenas fornece uma proteção parcial para infecções subsequentes, pois é de curta duração, sendo comuns as reinfecções ao longo da vida, mesmo que a primeira tenha sido grave (FARIA, 2012).

Mufson *et al.* (1987), realizaram um estudo com crianças que haviam se reinfectado com o VSR no período de um ano e nenhuma delas desenvolveu doença respiratória grave durante a segunda infecção, concluindo também não existir diferenças entre a imunidade conferida pelo tipo A e tipo B (MUFSON *et al.*, 1987).

Para verificar as respostas imunes às vacinas e fazer outros ensaios, alguns animais são utilizados como modelo para infecção pelo VSR, como no caso de roedores (ratos e porquinhos-da-índia), animais de grande porte (bovinos e ovinos), primatas não-humanos (chimpanzés, macacos verdes africanos, babuínos) e outros como o furão e a chinchila (GRAHAM, 2015).

Em seu artigo, Graham (2015) relata que utilizando esses modelos animais demonstrou-se que a imunidade contra a glicoproteína F proporciona uma maior proteção contra a reinfecção que a imunidade contra a proteína G ou as proteínas internas do vírus.

4.5 VARIABILIDADE GENÉTICA

Na segunda metade da década de 80 iniciaram-se os primeiros estudos sobre as bases genéticas da variação antigênica. Observou-se que os diferentes genótipos de VSR poderiam ser identificados, de acordo com a conformação da proteína G, que pode ter de 282 a 319 aminoácidos, dependendo do grupo ao qual pertence (MACHADO, 2012).

A variabilidade dos isolados dentro dos grupos A e B foi inicialmente demonstrada com diferença nas reações com *MAbs* e depois usando métodos de clivagem com enzimas de restrição, ensaio com RNase, ensaio com heterodúplex e análise de sequenciamento de nucleotídeos (PERDIGÃO, 2009). O sequenciamento de nucleotídeos do gene G auxilia na identificação desses genótipos, principalmente devido à variabilidade encontrada na região do ectodomínio, que consiste em duas regiões variáveis separadas por uma região conservada, presente em ambos os grupos. A análise das sequências de nucleotídeos da segunda região hipervariável do gene G (região G2) possibilita a classificação dos genótipos do VSR dentro dos grupos A e B (TAPIA *et al.*, 2014). Embora a região G2 seja a mais utilizada para genotipagem e classificação do VSR, a porção N-terminal da proteína G também é variável e pode ser utilizada para esta classificação (SALES, 2009). Por meio dessa metodologia, percebeu-se que a variabilidade de aminoácidos é superior a 20% dentro do grupo A e superior a 9% dentro do grupo B (CANE, 2001; MACHADO, 2012).

Ao comparar as sequências nucleotídicas e as sequências deduzidas de aminoácidos do mRNA do gene G das cepas protótipos A2, *Long* e CH 18537 observou-se que entre as amostras do mesmo grupo - A2 e *Long*, a divergência encontrada foi pequena, de 6% na sequência de aminoácidos. Quando comparadas sequências de grupos distintos, A2 (grupo A) e CH 18537 (grupo B) verificou-se que 47% da sequência de aminoácidos era diferente (SULLENDER, 2000).

Estudos complementares comparando as sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes das proteínas NS1, SH, F e N das amostras A2 e CH 18537 mostraram uma menor variação. As porcentagens de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos encontrados foram respectivamente de: 72 e 76% para o gene SH, 82 e 89% para o gene F, 83 e 87% para o gene NS1, 86 e 96% para o gene N (PERDIGÃO, 2009).

Posteriormente, observaram-se variações antigênicas dentro de cada grupo, possibilitando a divisão em genótipos característicos. Os estudos de variabilidade antigênica foram complementados com os estudos de variabilidade genômica servindo de base para um melhor entendimento sobre a circulação do vírus e da sua evolução.

De acordo com Cui *et al.* (2013), o VSR A é representado por, pelo menos, onze genótipos distintos (GA1 – GA7, SAA1, NA1 – NA2 e ON1) e o grupo B é dividido em vinte genótipos (GB1 – GB4, BA1 – BA10, SAB1 – SAB4, URU1 e URU2). Porém, Zlateva *et al.* (2005) relata em seu trabalho, que na Bélgica foram isolados genótipos que variavam do GB1 até o GB13, dessa forma, pode-se concluir que o grupo B apresenta pelo menos 32 genótipos. Os genótipos GA1 a GA6 do grupo A e GB1 a GB4 do grupo B, foram os primeiros a ser descritos (PERET *et al.*, 1998) (QUADROS 1 e 2).

O genótipo ON1 do grupo A, foi relatado no Canadá, identificado em amostras coletadas no final de 2010 (CUI *et al.*, 2013) e apresenta duplicação de 72 nucleotídeos no gene G, similarmente foi identificado em 1998, em Buenos Aires, a duplicação de 60 nucleotídeos no gene G, porém em amostras representantes do grupo B, sendo nomeado como genótipo BA. O genótipo BA espalhou-se rapidamente por diversos países, sendo considerado o genótipo mais prevalente do grupo B a partir de 2005 (TAPIA *et al.*, 2014).

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR GRUPO A

GRUPO	GENÓTIPOS	LOCAL (IS)	CARACTERÍSTICA (S)	REFERÊNCIA
A	GA1	Inglaterra, Europa Central, Cuba e Estados Unidos.	Predominantes no final déc. 80 e início de 90. Circulou em Cuba, após 1990. Nos EUA foi detectado de 2006 a 2010.	VALDES <i>et al.</i> , 1998; CANE, 2001; RAFIEFARD <i>et al.</i> , 2004; MACHADO, 2012.
	GA2	Suécia, Itália, Bélgica, Moçambique, África do Sul, EUA, Índia, América do Sul, Singapura, China, Japão e Brasil.	Circulou no Brasil em 1999 no nordeste (Salvador- BA) e sudeste. Em 2004 foi encontrado na cidade de São Paulo e Campinas. Em Fortaleza circulou de 2004 a 2008. Na China circulou entre 2000 e 2003.	PERET <i>et al.</i> , 1998; VENTER <i>et al.</i> , 2001; PERDIGÃO, 2009; MACHADO, 2012; TAPIA <i>et al.</i> , 2014.
	GA3	Inglaterra, Europa Central e China.	Predominantes no final déc. 80 e início de 90. Na China circulou entre 2000 e 2003.	VALDES <i>et al.</i> , 1998; CANE, 2001; RAFIEFARD <i>et al.</i> , 2004; MACHADO, 2012.
	GA4	Inglaterra e Europa Central.	Predominantes no final déc. 80 e início de 90.	VALDES <i>et al.</i> , 1998; CANE, 2001; RAFIEFARD <i>et al.</i> , 2004.
	GA5	Suécia, Itália, Bélgica, Moçambique, África do Sul, EUA, Índia, América do Sul, Singapura, China, Japão e Brasil.	Predomínio em muitos países nos últimos anos. Circulou no Brasil em 1999 no nordeste (Salvador – BA) e sudeste. Encontrado em São Paulo e Campinas (2004). Circulou em Fortaleza (2004- 2007). China circulou entre 2000 e 2003.	PERET <i>et al.</i> , 1998; VENTER <i>et al.</i> , 2001; PERDIGÃO, 2009; MACHADO, 2012; TAPIA <i>et al.</i> , 2014.
	GA6	Isolado em São Paulo (2008).	Foi um dos primeiros a ser descrito.	PERET <i>et al.</i> , 1998; NCBI, 2015.
	GA7	Alemanha, África do Sul e Brasil.	Entre 1997 a 2000 ocorreu em baixa frequência na África do Sul. Entre 1998 e 2007 foi encontrado na Alemanha. Circulou em Salvador -BA (1999)	SALES, 2009; MACHADO, 2012.
	SAA1	África do Sul e Brasil	Descrito em 2001 na África do Sul. Relatado em Campinas (2004).	VENTER <i>et al.</i> , 2001; MACHADO, 2012.
	NA1	Originou-se em Niigata, Japão.	Genótipo prevalente no Japão, Cambódia, Malásia e Canadá. Circulou entre 2004-2005 no Japão.	SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009; PARIS, 2012; CUI <i>et al.</i> , 2013.
	NA2	Originou-se em Niigata, Japão.	Circulou entre 2005-2006, responsável por um importante surto no Japão nessa época.	SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009.
	ON1	Relatado em 2010 no Canadá, Coréia do Sul, Itália e Sul da África. E em Beijing na China (2012).	Novo genótipo, com duplicação de 72 nucleotídeos no gene G, na segunda região hipervariável. Apresenta grande dispersão mundial.	CUI <i>et al.</i> , 2013; TAPIA <i>et al.</i> , 2014.

NOTA: Informações retiradas de diversos autores conforme indicado na coluna Referência.

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR DO GRUPO B (Continua)

GRUPO	GENÓTIPOS	LOCAL (IS)	CARACTERÍSTICA (S)	REFERÊNCIA
B	GB1	Bélgica	Genótipo mais prevalente na Bélgica durante a déc. 80, isolado de 1982 até 1990, exceto entre 1983 -1984.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB2	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1987/88, 1988/89, 1991/92, 1992/93, 1998/99.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB3	Suécia, África do Sul, Japão e Brasil.	De 1997 a 2000 foi detectado na África do Sul. Em 1999 circulou no nordeste (Salvador – BA) e sudeste do Brasil. Em 2004 foi encontrado em Campinas. Em Fortaleza circulou em 2005 e 2006.	PERDIGÃO, 2009; SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009; MACHADO, 2012.
	GB4	Brasil	Circulou em São Paulo entre 1999 e 2000.	SALES, 2009.
	GB5	Bélgica e Brasil	Linhagem dominante observada durante a estação epidêmica de 1983-1984 na Bélgica. Circulou em São Paulo entre 1999 e 2000.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005; SALES, 2009.
	GB6	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1996/97, 1999/2000.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB7	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos 1992/93, 1993/94, 1995/96.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB8	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1992/93, 1995/96, 1997/98.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB9	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1995/96.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB10	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1995/96, 1996/97, 1999/2000, 2001/02, 2002/03.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB11	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1996 – 2002.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB12	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1996 – 2003.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	GB13	Bélgica	Circulou na Bélgica entre os anos: 1998 - 2004.	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	BA1	Madrid (Espanha) e Argentina	Circulou em Madrid em 1999 e na Argentina em 2002.	NCBI, 2015.
	BA2	Japão	Circulou no Japão entre 2002-2003	SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009
	BA3	Argentina	Foi isolado entre 2002 -2004.	NCBI, 2015.

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR DO GRUPO B (Continuação)

GRUPO	GENÓTIPOS	LOCAL (IS)	CARACTERÍSTICA (S)	REFERÊNCIA
B	BA4	Japão e Sul do Brasil (Porto Alegre)	Foi encontrado no Japão entre os anos de 2003-2007. Circulou em 2010 no Brasil. Genótipo descrito por Trento e colaboradores em 2006.	SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009; PARIS, 2012.
	BA5	Japão	Circulou no Japão entre 2002-2003	SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009
	BA6	Bélgica	Isolado entre 2001 - 2003.	NCBI, 2015.
	BA7	Bélgica	Isolado em 2003.	NCBI, 2015.
	BA8	Niigata (Japão)	Isolado em 2006.	NCBI, 2015.
	BA9	Brasil	Circulou entre os anos de 2013 a 2014.	BALLALAI, 2015.
	BA10	Brasil	Circulou entre os anos de 2013 a 2014.	BALLALAI, 2015.
	SAB1	África do Sul e Brasil	Descrito pela primeira vez na África do Sul em 2001. Em 2004 circulou em São Paulo e em Campinas (Brasil).	VENTER <i>et al.</i> , 2001; MACHADO, 2012.
	SAB2	África do Sul	Descrito pela primeira vez na África do Sul em 2001.	VENTER <i>et al.</i> , 2001; MACHADO, 2012.
	SAB3	África do Sul, Japão e Brasil.	Descrito pela primeira vez na África do Sul em 2001. Em 2004 circulou em São Paulo e Campinas (Brasil). No Japão foi encontrado entre os anos de 2001 – 2007.	VENTER <i>et al.</i> , 2001; SHOBUGAWA, <i>et al.</i> , 2009; MACHADO, 2012.
	SAB4	Brasil	Isolado em Fortaleza em 2005.	NCBI, 2015.
	URU1	Uruguai	Isolado em Montevideu em 2001.	NCBI, 2015.
	URU2	Brasil	Em 2004 foi detectado em Campinas.	MACHADO, 2012.
	Variante BA	Descrita em 2005 na Bélgica.	Deleção de seis nucleotídeos devido à mudanças no <i>stop códon</i> .	ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005.
	BA	Identificado em 1998 em Buenos Aires (Argentina). Foi relatado na Europa e Ásia. No Brasil, em 2004 foi encontrado em São Paulo e Campinas. Em Fortaleza circulou em 2004, 2006 – 2008.	Duplicação de 60 nucleotídeos a partir do resíduo 791 do gene G, chamada de segunda região hipervariável. Espalhou-se ao redor do mundo durante 7 períodos epidêmicos, chegando a ser o genótipo mais prevalente do grupo B em 2005. Considerado um variante do genótipo GB3.	TRENTO <i>et al.</i> , 2003; NAGAI <i>et al.</i> , 2004; ZLATEVA; VAN RANST, 2004; ZLATEVA <i>et al.</i> , 2005; PERDIGÃO, 2009; MACHADO, 2012; TAPIA <i>et al.</i> , 2014.
	Outra variação do genótipo BA	Alguns vírus isolados em Buenos Aires (Argentina) em 2001.	Inserções menores (de três a seis nucleotídeos) também vêm sendo relatadas, demonstrando a grande variabilidade da proteína G.	TRENTO <i>et al.</i> , 2003; ZLATEVA <i>et al.</i> , 2007.

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS GENÓTIPOS, LOCAIS ENCONTRADOS E CARACTERÍSTICAS DO VSR DO GRUPO B **(Conclusão)**

GRUPO	GENÓTIPOS	LOCAL (IS)	CARACTERÍSTICA (S)	REFERÊNCIA
B	BA3737/99B	Circulou em Buenos Aires (Argentina) durante a epidemia de 1999.	Relacionado com o genótipo BA com apenas 8 nucleotídeos diferentes nos últimos 400 nt do gene G, nenhum deles no segmento duplicado característico do BA. Citam que um vírus similar a esse pode ter sido o ancestral dos vírus com a duplicação dos 60 nt.	TRENTO <i>et al.</i> , 2003.

NOTA: Informações retiradas de diversos autores conforme indicado na coluna Referência.

4.6 TRANSMISSÃO E PRECAUÇÕES

O VSR é altamente contagioso e é transmitido pelas secreções respiratórias por meio do contato próximo com pessoas infectadas ou com objetos ou superfícies contaminadas. A infecção pode ocorrer por auto-inoculação, por mãos contaminadas, por toque em superfícies não porosas contendo partículas infecciosas (nas quais o vírus pode sobreviver de 4 a 7 horas) (VIEIRA, 2009), por inoculação direta de gotículas nos olhos e nariz e também, por inalação de aerossóis emitidos por espirros ou tosse (FARIA, 2012).

O VSR cresce otimamente em pH 7,5 e é inativado a temperaturas entre 50 – 60°C. Apesar de ser sensível à temperatura, pode permanecer viável por mais de uma hora em luvas de borracha contaminadas com secreções nasais infectadas. Ainda assim, é rapidamente inativado por água, sabão e desinfetantes (HOWLEY, 2007; FARIA, 2012).

O período de incubação do VSR é de aproximadamente 2 a 8 dias (média de 5 dias) e a excreção viral pode ocorrer desde alguns dias antes do início dos sintomas e persistir por semanas em pessoas com alterações imunitárias e em portadores de doenças de base (VIEIRA, 2009). Popow-Kraupp e Aberle (2011) em relação à excreção viral relatam que em crianças mais velhas e adultos, o título e o tempo de excreção viral são menores, provavelmente por já terem apresentado reinfecções pelo VSR, sugerindo que a presença de anticorpos específicos contra o vírus interfira no grau de replicação viral.

Como forma de prevenção de disseminação viral, inclui-se o hábito da lavagem de mãos, o uso de aventais, máscaras e óculos para proteger os olhos e o nariz, evitar locais com aglomeração, entre outros (VIEIRA, 2009).

Ainda não está disponível para uso em humanos uma vacina que seja segura e eficaz contra o VSR (VIEIRA, 2009).

4.7 EPIDEMIOLOGIA

As infecções pelo VSR têm distribuição mundial e ocorrem anualmente. Estima-se que em todo o mundo o VSR seja responsável por cerca de 34 milhões de episódios de infecções respiratórias agudas e entre 66.000 a 199.000 mortes a cada ano (NOLAN *et al.*, 2015). Atribui-se a ele a responsabilidade por um terço das mortes entre crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento (CANE, 2001). Das infecções pelo VSR, acredita-se que em 25 a 33% dos casos, o trato respiratório inferior seja afetado e 1% seja grave o suficiente para necessitar de internamento hospitalar (FARIA, 2012). Além disso, sabe-se que as crianças hospitalizadas devido à infecção por VSR tendem a ser mais novas do que aquelas que são hospitalizadas devido a infecções por outros vírus respiratórios (FARIA, 2012).

O começo e o final da estação de circulação do VSR podem variar de ano para ano, estado para estado e até mesmo em comunidades na mesma região (REIS, 2006). Segundo Paris (2012), mudanças climáticas podem alterar a sazonalidade do VSR ou mesmo mudanças na distribuição de outros vírus respiratórios também podem alterar o padrão dos surtos sazonais do VSR.

Estudos tentam explicar essa divergência na sazonalidade e até um modelo matemático foi proposto para desvendar essas diferenças. De acordo com Weber, A.; Weber, M. e Milligan (2001) e com Waris e White (2006), o clima é a variável que mais influencia as epidemias do VSR e fatores como aumento de temperatura e maior incidência de luz ultravioleta contribuem para o declínio da infecção viral. Mesmo assim, ressalta-se que talvez a circulação viral não esteja relacionada apenas a fatores climáticos, mas também a hábitos sociais que proporcionam a aglomeração, favorecendo o risco de contaminação (WEBER; MULHOLLAND; GREENWOOD, 1998; WARIS; WHITE, 2006; MACHADO, 2012).

Em países com clima temperado, com áreas geográficas mais frias, o vírus aparece principalmente entre os meses de outono e inverno, enquanto nas regiões tropicais está associado com o período de chuvas (WEBER; MULHOLLAND; GREENWOOD, 1998; LAMARÃO, 2012).

De acordo com Faria (2012), em Portugal, a máxima incidência ocorre entre outubro e abril, que seria entre o outono, inverno e primavera. Em algumas regiões, as epidemias geralmente seguem um ciclo bienal, com uma época em que a epidemia é relativamente pequena seguida de outra maior (FARIA, 2012). Geralmente as epidemias duram cerca de cinco meses (REIS, 2006; SALES, 2009).

Um estudo feito na Áustria relata que a circulação do VSR ocorre no final do outono, no inverno e início da primavera, com picos entre janeiro e março, apresentando detecção de casos esporádicos durante o ano (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

Englund (2015) relata que em regiões temperadas do norte, como América do Norte e Europa, o VSR circula entre novembro e fevereiro, ou seja, entre o outono e inverno. Reis (2006) cita que em países como EUA, Japão e França, a circulação do VSR acontece de novembro a abril, com picos entre dezembro e janeiro, justamente no inverno.

Em áreas tropicais do norte, como Índia e Nepal, o VSR ocorre entre os meses de agosto a novembro, final da época chuvosa (quente e úmida) e início do clima frio. Em relação à região equatorial, como Singapura, o vírus aparece durante todo o ano. Na região sul tropical, como a Argentina, o VSR circula entre junho e setembro (meses de inverno) e nos locais com climas temperados na região Sul, como a África do Sul e Austrália, ele é encontrado entre os meses de março e julho, também relacionados ao outono e inverno (ENGLUND, 2015).

No Brasil, um país com dimensões continentais, o padrão de circulação do VSR diverge de acordo com os diferentes climas apresentados, podendo haver co-circulação de diferentes genótipos dos grupos A e B (MACHADO, 2012).

Moura *et al.* (2013) relatam que o início da estação do VSR em Fortaleza, no Ceará, pode variar entre fevereiro a maio, mas o final sempre acontece em julho.

Uma pesquisa realizada em Ribeirão Preto, São Paulo, por Gagliardi *et al.* (2013) mostrou que a positividade para o VSR ocorreu de fevereiro a novembro, com pico de atividade entre abril e junho, correspondendo ao outono. Já no estudo de Vieira *et al.* (2001), na cidade de São Paulo, os picos de circulação foram em maio e

junho. Reis (2006) que também realizou seu estudo em São Paulo percebeu que as infecções respiratórias pelo VSR ocorrem entre os meses de fevereiro a setembro, com picos de incidência nos meses de maio a junho, relacionando-se com as estações de outono-inverno, corroborando com os achados de Vieira *et al.* (2001).

Na região sul do Brasil, a Nota Técnica Conjunta da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, descreve que o período de sazonalidade do VSR para o Paraná ocorre entre abril a agosto de cada ano (PARANÁ, 2015). Tsuchiya *et al.* (2005) demonstraram em sua pesquisa realizada na cidade de Curitiba, nesse mesmo estado, que o pico de circulação do vírus concentra-se entre os meses de maio a julho, principalmente no inverno, reforçando o que também foi encontrado por Raboni *et al.* (2011). Em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, os picos de incidência ocorreram nos meses de julho e agosto (REIS, 2006).

Independente da sazonalidade, a gravidade da doença do trato respiratório pode variar a cada infecção, pois alternâncias entre os grupos e genótipos circulantes podem contribuir para a variação da gravidade anual de cada surto (REIS, 2006).

4.8 ASPECTOS CLÍNICOS

O VSR é o agente patogênico mais importante causador de doença respiratória aguda em lactentes e crianças até os dois anos (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011), com picos de incidência entre o segundo e o sexto mês de idade, sobretudo causando bronquiolite e pneumonia (CRUZ, 1998; FARIA, 2012; NOLAN *et al.*, 2015).

Ainda que a população pediátrica seja a mais exposta à infecção, os idosos, principalmente os que vivem em centros de cuidados, mostraram ser também bastante susceptíveis às infecções por esse vírus, sendo este responsável por 10% a 20% das pneumonias e 2% a 5% de mortes anualmente neste grupo de pacientes. Além disso, o VSR compreende 17% das infecções respiratórias em pacientes com doenças cardiopulmonares, enquanto que em asmáticos e pessoas imunodeprimidas as taxas de incidência podem chegar a 31% (FALSEY; WALSH, 2000).

As manifestações clínicas associadas ao VSR são dependentes da idade. Até o segundo ano de vida, predominam os quadros de bronquiolite e pneumonia, e

com menor frequência a traqueobronquite e laringotraqueobronquite (KIM *et al.*, 1973).

Os sintomas incluem manifestações clínicas típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e, algumas vezes sibilância, evoluindo geralmente, para a recuperação no período de uma a três semanas. Também podem aparecer sintomas como diminuição do apetite, além da ocorrência de complicações como otite média e sinusite (REIS, 2006; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

As crianças prematuras com infecção pelo VSR apresentam, com maior frequência, apneia, cianose, atelectasias, necessidade de hospitalização e de ventilação mecânica, além de internações mais prolongadas (VIEIRA, 2009).

Além dos sintomas mais comuns das infecções do trato respiratório inferior (ITRI) ocorrem uma variedade de manifestações extrapulmonares, que vão desde o comprometimento cardíaco, síndrome “*sepsis-like*” e envolvimento do sistema nervoso central, resultando em convulsões, parada cardíaca e hipertonia em crianças com doença grave pelo VSR (ZLATEVA; VAN RANST, 2004; MILLICHAP; WAINWRIGHT, 2009). Ainda não há certeza se essas manifestações representam efeitos diretos ou indiretos do vírus (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

De fato, os quadros clínicos mais graves, caracterizados por apneia ou insuficiência respiratória grave, as complicações e a mortalidade são mais frequentes em determinados grupos de risco e/ou devido a fatores de risco, quer demográficos, quer ambientais, que predispõe as crianças à infecção grave por VSR e consequente hospitalização (FARIA, 2012).

De acordo com Vieira (2009), Faria (2012) e Silva (2014) são considerados fatores de risco e de suscetibilidade para infecções por VSR: prematuridade; idade (menores que 6 meses); sexo masculino; portadores de doenças prévias como: imunodeficiências, displasia broncopulmonar, cardiopatia congênita, doenças metabólicas, genéticas; malformações anatômicas; doenças neuromusculares; história familiar de asma; desnutrição; nascimentos múltiplos; nascimento nos seis meses que antecedem a estação do VSR; ausência/ duração do aleitamento materno; aglomerações de pessoas, inclusive domicílio, creches e transportes públicos, nos meses mais frios e secos; poluição ambiental; tabagismo passivo; irmãos em idade escolar e hospitalizações prolongadas durante a sazonalidade do vírus.

Alguns destes fatores não estão bem compreendidos em relação à sua influência na predisposição à infecção pelo VSR (MARTINELLO *et al.*, 2002).

Ao replicar-se nas células do trato respiratório, o vírus causa necrose e danos diretos nos cílios ou, indiretamente, pela promoção de respostas inflamatórias que levam à destruição do epitélio, edema e aumento na produção de muco (CRUZ, 1998). Após um período de incubação médio de 3 – 5 dias, o quadro clínico inicia-se com sintomas das vias aéreas superiores semelhantes à rinite comum, e evolui com o acometimento das vias aéreas inferiores, sendo a obstrução dos bronquíolos o mais frequente (bronquiolite) (FARIA, 2012).

A maioria destas infecções não deixa sequelas, contudo, em alguns casos, pode ter implicações na saúde futura da criança. A este respeito, vários estudos tentam demonstrar a associação entre a infecção por VSR e hospitalizações frequentes devido à problemas respiratórios na primeira década de vida, com distúrbios respiratórios a longo prazo como função pulmonar anormal, asma, tosse recorrente e bronquite (SALES, 2009; FARIA, 2012; LAMARÃO *et al.*, 2012).

Algumas hipóteses sugerem que a relação entre elas esteja na alteração da resposta imune perante os diferentes alérgenos, indução de uma inflamação típica de asma alérgica por interação com os linfócitos T ou potencialização da inflamação alérgica (FARIA, 2012).

4.9 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Os lactentes e as crianças com fatores de risco para infecções graves pelo VSR podem receber doses mensais de Palivizumab (Synagis®), um anticorpo monoclonal (IgG1) humanizado de camundongo, anti-VSR, direcionado para um epítipo no sítio antigênico A da proteína F do VSR, que atua como um imunobiológico profilático, durante os períodos de circulação viral. A Sociedade Brasileira de Pediatria tem recomendado o uso do Palivizumab® em cinco doses para: crianças nascidas prematuras (com idade para aplicação e início da imunoprofilaxia variando em relação à idade gestacional de nascimento e o início do período de sazonalidade do VSR) e crianças menores de 2 anos (com comorbidades pulmonares, cardíacas ou imunes) (PARIS, 2012). Este tratamento é caro e o custo-efetividade da terapia pode ser melhorado se esta for usada apenas durante os períodos de circulação viral (KURT *et al.*, 2011).

O tratamento baseia-se nas medidas de suporte, como administração de oxigênio e hidratação, sendo que o uso dos broncodilatadores é controverso, uma vez que são mais efetivos no início da infecção, momento em que as vias aéreas de menor calibre ainda não estão obstruídas com secreções. Em alguns casos, são utilizados corticosteróides sistêmicos e/ ou inalatórios e fármacos antivirais. O agente antiviral mais utilizado, a ribavirina em aerossol (Virasole®), foi aprovada em 1986 para tratamento de crianças com doença severa por VSR (PARIS, 2012).

Este medicamento atua na enzima RNA polimerase viral (MACHADO, 2012) e está associado a benefícios clínicos limitados que não são capazes de justificar o seu uso, uma vez que os custos são elevados, apresenta alta toxicidade e existem dificuldades consideráveis na sua administração, principalmente nos doentes em ventilação mecânica (FARIA, 2012).

4.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico precoce adquire especial importância para efetuar terapia antiviral, se necessário, bem como para serem tomadas medidas de isolamento para prevenção da infecção hospitalar, diminuir a necessidade de procedimentos adicionais de diagnóstico e o tempo de internação, contribuindo para o uso racional de antibióticos (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011; FARIA, 2012).

O diagnóstico do VSR pode ser direto, pela detecção dos antígenos virais, do ácido nucléico e/ou do vírus infectante ou indireto, pela detecção de anticorpos específicos contra o vírus. O tipo e a qualidade da amostra clínica exercem grande influência sobre a sensibilidade e a especificidade do teste utilizado para a detecção dos agentes virais. Por isso, foi demonstrado que o lavado nasal ou o aspirado de nasofaringe (ANF) são mais sensíveis para a detecção de VSR do que a amostra de *swab* de nasofaringe (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

Para o diagnóstico laboratorial as metodologias mais utilizadas são: o isolamento do vírus em cultura de células, a detecção do antígeno por imunofluorescência (IF) ou ensaio imunoenzimático e a detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa) (PERDIGÃO, 2009). As técnicas utilizadas dependerão das condições do laboratório e da demanda de amostras encaminhadas.

4.10.1 Isolamento viral

O isolamento em cultura de células pode ser realizado em ampla variedade de linhagens de células humanas e animais. Geralmente esta metodologia é empregada para pesquisas e subtipagem viral, pois o isolamento aumenta a concentração viral, melhorando a sensibilidade da técnica utilizada posteriormente (PARIS, 2012). As linhagens mais utilizadas são a HEp-2 (carcinoma de laringe humana), A549 (células de carcinoma de pulmão humano) e a NCI-H92 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano). O efeito citopático (ECP) característico é a formação de sincícios resultantes da fusão das células que aparecem dentro de três a sete dias após a inoculação. Após o aparecimento do ECP a confirmação do isolamento viral é feita com reações utilizando anticorpos específicos ou técnicas moleculares. Uma variação da cultura celular é o método de centrifugação rápida (*shell vial*), no qual as amostras são inoculadas em células, centrifugadas e incubadas por dois dias. Após esse processo o material é submetido à reação de imunofluorescência indireta para a detecção dos antígenos virais (CRUZ, 1998; PERDIGÃO, 2009; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

4.10.2 Imunofluorescência (IF)

A detecção de antígenos por IF de vírus respiratórios, normalmente utiliza painéis que contemplam a detecção de diversos agentes, que podem variar de acordo com o kit em uso (PARIS, 2012). A IF é uma técnica bastante utilizada, por se tratar de um método rápido e de fácil execução quando comparado ao isolamento em cultura celular. Entretanto, esse método requer cuidados essenciais para o seu sucesso, tais como a presença de um número adequado de células na amostra, qualidade do anticorpo monoclonal utilizado e um microscopista experiente. Tanto a imunofluorescência direta (IFD) como a indireta (IFI) podem ser utilizadas para diagnosticar o VSR (PERDIGÃO, 2009).

4.10.3 RT-PCR

A técnica de RT-PCR pode ser *uniplex* ou *multiplex*, dependendo se a detecção será apenas do VSR ou de múltiplos vírus respiratórios, o que apresenta

maior custo-benefício, uma vez que são diversos os vírus respiratórios associados com as infecções do trato respiratório superior e inferior, as quais clinicamente são indistinguíveis. Recentemente diversos kits comerciais que utilizam o RT-PCR *multiplex* têm sido oferecidos no mercado, principalmente com a disponibilização de novas metodologias de detecção, como a RT-PCR em tempo real, em que a utilização de sondas específicas para múltiplos vírus permite detecção de quantidades de cargas virais pequenas na amostra clínica, com alta sensibilidade e especificidade. A metodologia *multiplex* utiliza pares de iniciadores (*primers*) desenvolvidos para genes altamente conservados, favorecendo a identificação de diferentes gêneros destes microrganismos, tanto em reações separadas que compartilhem condições de amplificação semelhantes, como pela combinação de múltiplos iniciadores em uma única reação de amplificação (THOMAZELLI, 2004).

Por possuir essa característica de ser mais sensível que outros testes, esta técnica auxilia no diagnóstico para grupos etários mais velhos, pois como já foi dito, possuem uma menor excreção viral em relação às crianças (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

O desenvolvimento da metodologia DPO (*Dual Priming Oligonucleotide*) tem contribuído também para aumentar a sensibilidade das reações de PCR convencionais, já que contêm vários pares de iniciadores na reação, em um sistema funcional e estruturalmente diferente dos iniciadores convencionais. No sistema DPO, os iniciadores são constituídos por dois segmentos diferentes com propriedades de anelamento distintas, o mais longo 5' – inicia uma ligação estável, e um segmento menor 3' – , determina a extensão do alvo específico (SEEGENE, 2015).

4.11 COINFECÇÃO VIRAL

De acordo com De Paulis *et al.* (2011), a detecção das coinfeções virais tornou-se mais frequente com a utilização dos métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitiu não só a amplificação de um número maior de vírus identificados, mas também a detecção de mais de um vírus na mesma amostra, visto que é uma metodologia mais sensível que as outras que eram utilizadas, como o cultivo celular e a imunofluorescência (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que o termo codetecção é mais preciso do que coinfeção,

principalmente quando técnicas de diagnóstico molecular são utilizadas, pois a detecção da presença viral não necessariamente significa que esse organismo está causando a doença especificamente (SLY; JONES, 2011).

De Paulis *et al.* (2011), relatam coinfeções virais em lactentes hospitalizados com infecções agudas do aparelho respiratório inferior, durante uma análise retrospectiva de 304 lactentes hospitalizados, dos quais foram coletadas amostras de nasofaringe. Destas 304, foram identificadas infecções virais em 72% (219). Das infecções virais, o VSR representava 80% (176). Quase 1/3 daquelas infectadas com o VSR (31,3%) estavam coinfectadas com outros vírus, sendo 24 com adenovirus, 16 com metapneumovirus humano e 15 com outros vírus menos comuns. Em seu estudo, De Paulis *et al.* (2011), não puderam investigar a infecção pelo rinovírus, portanto, a taxa de coinfeção pode ter sido subestimada. Também não encontraram um aumento na gravidade clínica nos lactentes infectados com VSR que estavam coinfectados com outro vírus respiratório.

Sly e Jones (2011) citam que o rinovírus é detectado em elevada porcentagem nas crianças, mesmo após a resolução dos sintomas clínicos agudos, o que pode ser explicado em virtude da capacidade deste vírus em infectar o epitélio brônquico, permanecendo nas vias aéreas das crianças após a infecção. Esses autores também relatam que as vias aéreas inferiores de indivíduos saudáveis não estão estéreis e têm populações bacterianas e virais residentes, que podem estar alteradas durante a doença respiratória.

O significado da detecção de múltiplos agentes virais na mesma amostra permanece pouco esclarecido e pode causar incertezas quanto ao prognóstico das infecções (DE PAULIS *et al.*, 2011). Não há consenso na literatura se a codetecção viral em crianças hospitalizadas com doenças do aparelho respiratório inferior está associada a uma gravidade maior da doença ou não, como se pode observar na TABELA 1 presente no trabalho de Sly e Jones (2011).

TABELA 1 - IMPACTO DA COINFECÇÃO VIRAL NA GRAVIDADE CLÍNICA DA DOENÇA EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

Estudo	Cenário	População	Vírus mais comuns identificados	Codeteccção	Efeito da codeteccção
Richard et al. ⁸ Retrospectivo 2003/2004	Hospital, França	Lactentes < 1 a, BVA unidade de permanência curta (n = 92) ou UTIP (n = 88)	Vírus em 96,1% (PCR/IF) VSR (70,6%; 73,6%) RVH (18,5%; 25,3%)	24,4%	Risco maior de UTIP [RC = 2,7 (IC95% 1,2-6,2)]
Cilla et al. ⁹ Prospectivo 2004/2006	Hospital, Espanha	Crianças < 3 a, PAC (n = 315)	Vírus em 66,9% (PCR/cultura) VSR 19,8% Bocavírus 14,2% RVH 13,6%	27%	Mais frequente em lactentes Hospitalização maior (67,2% versus 46,1%, p = 0,005)
Calvo et al. ¹⁰ Prospectivo 2000/2003	Hospital, Espanha	Crianças < 2 a, DRA (n = 749)	Vírus em 65,9% (PCR) VSR 35,4% Adenovírus 19,3% RVH 13,5%	17,4%	Febre mais alta Hospitalização mais longa
Canducci et al. ¹¹ Prospectivo 2004/2006	Hospital, Itália	Crianças < 2 a, DRA (n = 322)	Vírus em 46,6% (PCR) VSR 28% MPV-h 14,3% (RVH não testado)	14%	VSR mono-infecção mais grave
Aberle et al. ¹² Prospectivo 2000/2004	Hospital, Áustria	Lactentes < 1 a, DARI (n = 772)	Vírus em 77% (PCR) VSR 28% RVH 32%	26%	VSR coinfeccção com curso clínico mais grave
Suryadevara et al. ¹³ Prospectivo 2007/2010	Hospital, EUA	Crianças < 2 a, DRA (n = 201)	Vírus em 93% (PCR) VSR 58% RVH/enterovírus 33%	28%	Sem impacto na gravidade
Nascimento et al. ¹⁴ Prospectivo 2006/2007	Hospital, Brasil	Crianças < 2 a, BVA (n = 77)	Vírus em 93,5% (PCR) VSR 63,6% RVH 39%	44%	Sem impacto na gravidade
Stempel et al. ¹⁵ Retrospectivo 2003/2004 (n = 180)	Hospital, EUA	Crianças < 2 a, BVA	Vírus em 93% (PCR) VSR 71% Adenovírus 15% (RVH não avaliado)	23%	Sem comentários
Marguet et al. ¹⁶ Prospectivo 2002/2004	Hospital, França	Crianças < 1 a, BVA (n = 209)	Vírus em 94,7% (PCR/IF) VSR 60,3% RVH 21,5%	21,5% (VSR/RVH)	Infecção VSR mais grave do que RVH Sem impacto da coinfeccção
De Paulis et al. ⁷ Retrospectivo 2005	Hospital, Brasil	Crianças < 2 a, DARI (n = 304)	Vírus em 72% (PCR) VSR 80,4% Adenovírus 9,1%	25,1%	Sem impacto na gravidade

a = ano; BVA = bronquite viral aguda; DRA = doenças respiratórias agudas; DARI = doença do aparelho respiratório inferior; IC95% = intervalo de confiança de 95%; IF = imunofluorescência; MPV-h = metapneumovírus humano; PAC = pneumonia adquirida na comunidade; PCR = polymerase chain reaction; RC = razão de chance; RVH = rinovírus humano; UTIP = unidade de terapia intensiva pediátrica; VSR = vírus sincicial respiratório.

FONTE: SLY; JONES (2011).

Dez estudos citados por Sly e Jones (2011) utilizaram técnicas moleculares, isoladas ou em combinação com diagnósticos convencionais, para determinar a etiologia viral das doenças respiratórias agudas (TABELA 1). Desses estudos, quatro (ABERLE *et al.*, 2005; CALVO *et al.*, 2008; CILLA *et al.*, 2008; RICHARD *et al.*, 2008) relataram aumento na gravidade clínica em crianças com mais de um vírus detectado. Um dos estudos (CANDUCCI *et al.*, 2008) relatou que a infecção somente pelo VSR era mais grave do que quando um segundo vírus era detectado; quatro

estudos (MARGUET *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2010; DE PAULIS *et al.*, 2011; SURYADEVARA *et al.*, 2011) relataram que a codetecção não estava associada a um aumento na gravidade clínica; e um estudo (STEMPEL *et al.*, 2009) não comentou sobre a gravidade.

Ainda que a codetecção seja relatada mais frequentemente em lactentes e crianças mais novas (STEMPEL *et al.*, 2009), e as doenças respiratórias, principalmente a bronquiolite aguda, sejam frequentemente mais graves nessa faixa etária, a idade por si só não explica os relatos conflitantes na literatura (SLY; JONES, 2011).

É preciso levar em consideração que um diagnóstico correto favorece o tratamento adequado e é importante para instituir procedimentos que restrinjam a infecção hospitalar, principalmente as infecções cruzadas, pois em casos onde haja infecção apenas pelo VSR, recomenda-se alojar essa criança somente com uma que tivesse o mesmo vírus e não com outra que além desse vírus tivesse o HRV ou hMPV, por exemplo. O ideal seria que cada criança hospitalizada com doença respiratória aguda ficasse em um quarto separado, porém em muitos hospitais, essa recomendação não pode ser seguida (SLY; JONES, 2011).

4.12 MÉTODO TAGUCHI

Trata-se de uma metodologia proposta por Genechi Taguchi, no início da década de 80 (COBB; CLARKSON, 1994; A METODOLOGIA DE TAGUCHI, 2014), que pode ser considerada como uma nova abordagem para a área da qualidade. Reúne um conjunto de técnicas que buscam aperfeiçoar o trabalho, usando matrizes ortogonais.

De acordo com Toledo, Azeka e Amaral (1999), a utilização dessa análise permite identificar os parâmetros ótimos do teste, que minimizam ou eliminam influências de fatores que venham a interferir no desempenho. Utiliza-se de um modelo estatístico aplicado aos dados coletados no experimento e com técnicas de otimização, procura-se os valores dos parâmetros ótimos para um melhor desempenho do teste.

Button (2012) cita que o método de Taguchi propõe que se analise a resposta média para cada combinação no arranjo interno, e que a variabilidade seja

analisada escolhendo uma razão sinal-ruído (SN) apropriado. Três razões SN padrão são amplamente empregadas:

1. A *melhor nominal* SN_T , usada quando se deseja reduzir a variabilidade em torno de um valor nominal;
2. A *quanto maior melhor* SN_L , usada quando se deseja maximizar os resultados;
3. A *quanto menor melhor* SN_s , usada quando se deseja minimizar os resultados ou ter menos desperdício.

Após a obtenção dos melhores parâmetros, necessita-se validá-los. Os resultados dessa validação devem coincidir com os resultados obtidos na análise anterior. Caso isto ocorra, o modelo é considerado confiável e os parâmetros aprovados. Por outro lado, se houver diferença nos resultados, deve-se reavaliar o teste e seu planejamento, pois algum parâmetro pode não ter sido considerado ou algum problema na execução dos experimentos ocorreu.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

Esse foi um estudo do tipo observacional, analítico, transversal com coleta retrospectiva de dados.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC-UFPR), CAAE: 18714013.4.0000.0096 (ANEXO 1).

5.3 MATERIAL

A pesquisa foi realizada com amostras clínicas de ANF e lavado bronco alveolar (BAL, do inglês: *bronchoalveolar lavage*) de pacientes de 0 a 14 anos, coletadas e encaminhadas ao laboratório de virologia do HC-UFPR, para a pesquisa de vírus respiratórios, de julho de 2011 a maio de 2013. A amostra clínica foi acondicionada em tubos cônicos de polipropileno livre de RNase/DNase de 15 mL, contendo meio de transporte viral apropriado (ANEXO 2) e foi encaminhada imediatamente sob refrigeração, até o laboratório de virologia para processamento e análise. Durante o processamento, alíquotas da amostra foram separadas em tubo livre de RNA/DNase para a extração do material genético. O material restante foi armazenado a temperatura de -80°C.

5.3.1 Critérios de elegibilidade

5.3.1.1 Critérios de inclusão

Amostras pediátricas (0 – 14 anos de idade), encaminhadas ao laboratório de virologia para a pesquisa de vírus respiratórios, com detecção de VSR, entre julho de 2011 e maio de 2013.

5.3.1.2 Critérios de exclusão

Quantidade de amostra clínica insuficiente para a realização das metodologias, faixa etária diferente da preconizada no estudo, internamento em clínicas relacionadas ao tratamento de doenças sanguíneas como transplante de células tronco-hematopoéticas ou quimioterapia e negatividade para VSR.

5.3.2 Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos analisados foram coletados por revisão dos prontuários médicos dos pacientes que foram internados no HC-UFPR. Definiu-se como doença grave a necessidade de ventilação mecânica, admissão em UTI ou evolução fatal. Foram observados os seguintes parâmetros:

5.3.2.1 Demográficos

- Idade (em meses);
- Sexo;
- Idade gestacional (em semanas) na época do nascimento;
- Histórico familiar de asma;
- História pessoal de atopia;
- Presença de comorbidades como doença pulmonar crônica, cardiopatias, doenças genéticas entre outras.

5.3.2.2 Epidemiológicos

- Mês da infecção;
- Exposição a tabagismo passivo;
- Número de internamentos prévios por quadro respiratório.

5.3.2.3 Clínicos

- Local de internamento: Enfermaria ou UTI;
- Diagnóstico: traqueobronquite, bronquiolite, laringite, pneumonia viral, pneumonia bacteriana, apneia;
- Monoinfecção ou coinfecção;
- Tempo de internamento (em dias);
- Necessidade de ventilação mecânica;
- Necessidade de oxigênio;

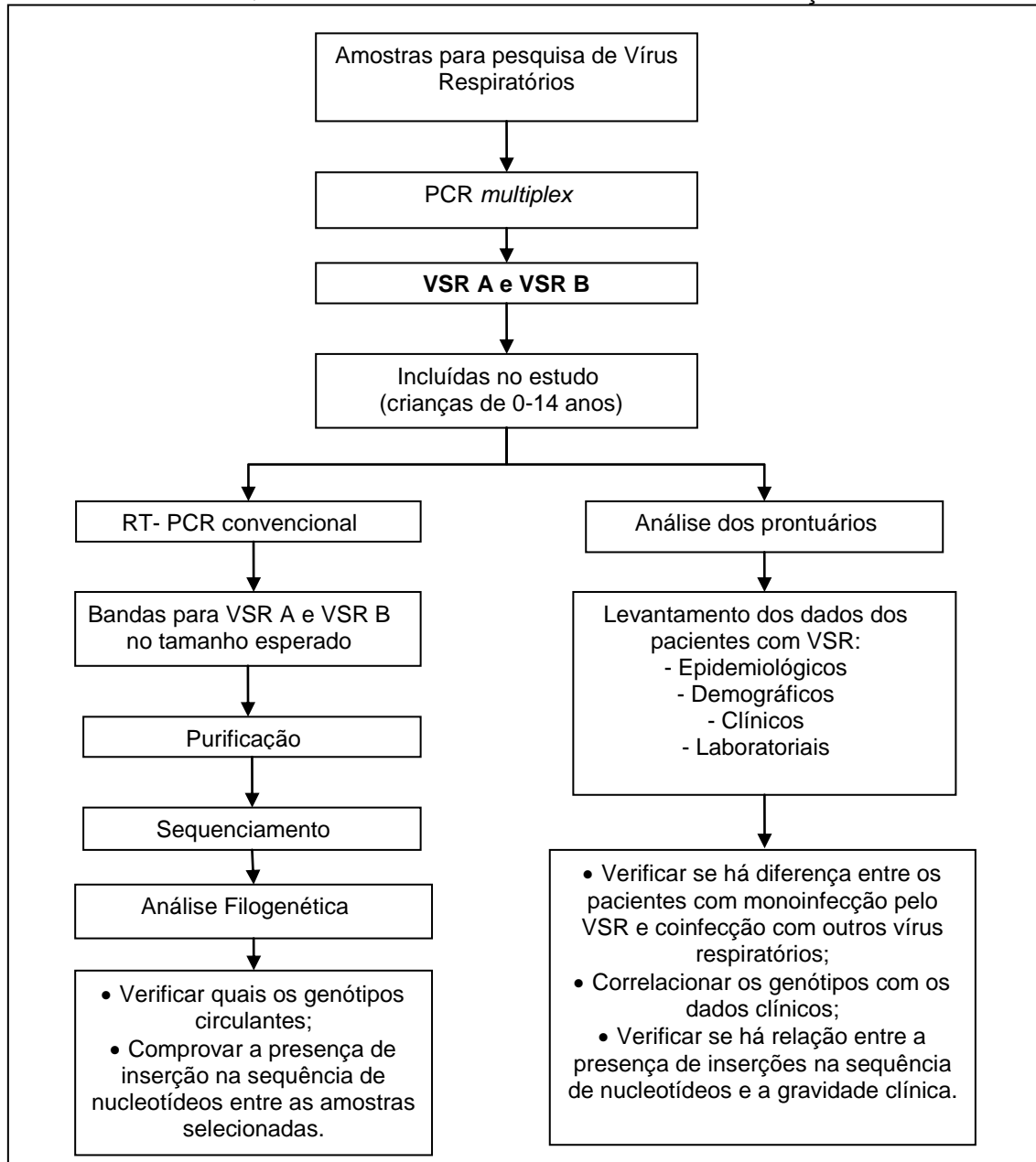
- Número de dias de uso de oxigênio;
- Presença ou ausência de febre;
- Presença de esforço respiratório;
- Uso de antibiótico;
- Evolução clínica: Alta hospitalar ou óbito.

5.3.2.4 Laboratoriais

- Valor da proteína C reativa;
- Número total de leucócitos;
- Tipo de vírus identificado: VSR, metapneumovirus, parainfluenza, rinovirus, adenovirus, enterovirus, bocavirus ou coronavirus.

De uma forma resumida, o presente estudo foi desenvolvido conforme esquematizado no fluxograma descrito na FIGURA 6.

FIGURA 6- ETAPAS QUE FORAM DESENVOLVIDAS PARA A REALIZAÇÃO DO TRABALHO



FONTE: A autora (2015).

5.4 MÉTODOS

5.4.1 Processamento das amostras

O frasco contendo a amostra clínica foi homogeneizado em *vórtex* para desprender as células do muco, sendo em seguida submetido à centrifugação por 10 minutos a 129 x g em centrífuga Fanem® Baby®I Modelo 206 BL. No fluxo laminar, após assepsia e com o auxílio de uma pipeta, foram separados em tubo cônico de

polipropileno livre de RNase/DNase de 1,5mL, 200 µL da amostra para realização da técnica de PCR e 1mL foi armazenado a -80°C para estudos posteriores.

5.4.2 Extração do genoma viral

O processo de extração do material genético foi todo realizado em banho de gelo para evitar sua degradação. A técnica de extração foi realizada com o kit *PureLink® Viral RNA/DNA*, *Invitrogen™*, seguindo instruções do fabricante, que consistia nos seguintes passos: Em um tubo cônico de polipropileno livre de RNase/DNase de 1,5mL, acrescentou-se 5,6µL de *Carrier RNA* (previamente diluído), adicionou-se 200 µL da amostra, 200 µL de tampão de lise viral e 25 µL de proteinase K (reagentes incluídos no kit). Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 15 segundos, incubados a 56°C por 15 minutos e centrifugados rapidamente para remover as gotas da tampa. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de etanol absoluto (96 – 100%), homogeneizando-se em vórtex por 15 segundos e ficando 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado rapidamente para remover as gotas da tampa e o sobrenadante foi transferido para a coluna de sílica em outro tubo. O conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 6800 x g e foi transferido para outro suporte limpo. Neste foram adicionados 500 µL de *Wash Buffer* (W5) e a coluna com o suporte foi centrifugada por 1 minuto a 6800 x g novamente. O líquido foi descartado e da mesma maneira, adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer* (W5) e centrifugou-se por 1 minuto a 6800 x g. O sobrenadante foi descartado e a coluna com o suporte foi colocada mais uma vez na centrífuga por 1 minuto em rotação máxima para secar todo o etanol. Posteriormente a coluna foi transferida para outro tubo de 1,5 mL e o RNA foi eluído em 60 µL de água livre de RNase (E3). Deixou-se 5 minutos em temperatura ambiente e a coluna foi centrifugada com o suporte por 1 minuto em rotação máxima. Após isso, a coluna foi descartada e o que restou no tubo foi o material genético extraído. Em seguida, o extraído foi quantificado em espectrofotômetro (*Nanodrop*) e armazenado em freezer a – 80°C.

5.4.3 Síntese do DNA complementar

Como o vírus analisado possui material genético composto por RNA, essa etapa foi necessária para que a síntese do DNA complementar (cDNA) pudesse servir de molde para a amplificação realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por uma enzima transcriptase reversa dependente de RNA, usando iniciadores randômicos hexâmeros (*random hexanucleotide primers*).

Utilizou-se para a obtenção do cDNA, a enzima *SUPERSCRIPT II*, *Invitrogen*TM, de acordo com a orientação do fabricante.

Inicialmente preparou-se a mistura (mix) com os seguintes reagentes: 2,5 mM de dNTP's, 5X *Buffer* (Tampão da reação), 0,1 M DTT (Ditiotreitol), RNase *out* e RT *Superscript II* (Enzima transcriptase reversa). Posteriormente, em um tubo cônico de polipropileno (*RNase free*) de 1,5 mL adicionou-se 7,5 µL da amostra extraída (concentração do material genético deve ser de 10 a 500 ng), 1,0 µL de água ultra-pura e 1,0 µL de *random hexanucleotide primer* (previamente diluído, na concentração final de 62,5 ng/µL) e incubou-se o tubo em termobloco a 65°C por 5 minutos. Em seguida, retirou-se o tubo e acrescentou-se 10,5 µL do mix de reagentes, levando-o para o termobloco a 25°C por 10 minutos. Posteriormente o tubo foi incubado a 42°C por 50 minutos e finalmente a 70°C por 15 minutos. Após esse período de incubação o tubo foi colocado em gelo. Caso o conteúdo fosse utilizado no mesmo dia, o material poderia ser guardado em geladeira, caso contrário, foi armazenado em freezer a -20°C.

5.4.4 Detecção e tipagem de VSR em amostras respiratórias

5.4.4.1 RT-PCR *multiplex*

A detecção do VSR presente nas amostras de ANF ou BAL foi feita por meio da metodologia de RT-PCR *multiplex*, com o kit comercial *Seeplex*® RV15 *ACE Detection* (Seegene Inc, Korea), o qual permite a detecção de 15 tipos virais. Os vírus detectados por esta técnica são: adenovírus humano, metapneumovírus humano, parainfluenza tipos 1, 2, 3 e 4, influenza A, influenza B, vírus sincicial respiratório A e B, rinovírus humano, enterovírus humano, bocavírus humano, alfa-

coronavírus (229E/NL63) e beta-coronavírus (OC43/HKU1), de acordo com o QUADRO 3.

QUADRO 3 – RELAÇÃO DO TIPO VIRAL DE CADA CONJUNTO PESQUISADO (A, B E C) E DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR MEIO DA METODOLOGIA UTILIZANDO O KIT RV15 *ACE DETECTION*

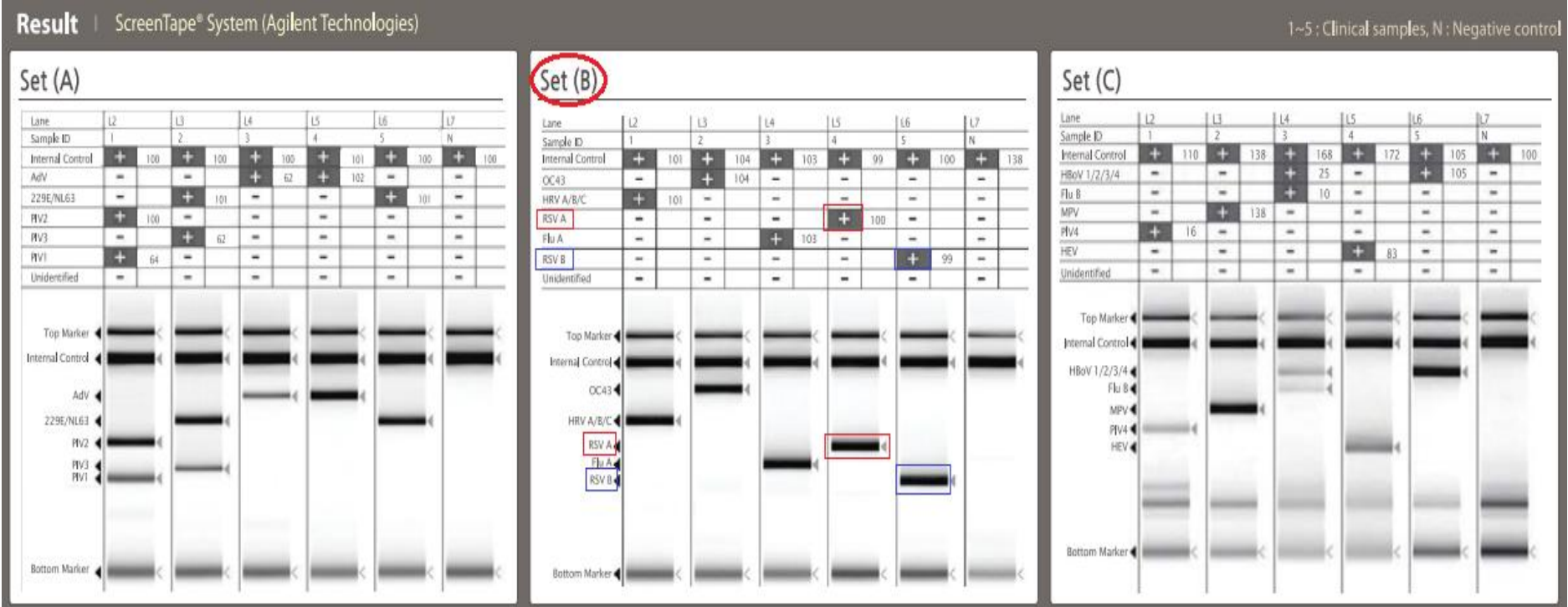
RV15 OneStep ACE Detection (Conjunto A)	Tamanho do produto em gel de agarose (bp)
Controle interno	850
Adenovirus humano	534
Coronavirus humano 229E/NL63	375
Parainfluenza vírus humano 2	264
Parainfluenza vírus humano 3	189
Parainfluenza vírus humano 1	153
RV15 OneStep ACE Detection (Conjunto B)	Tamanho do produto em gel de agarose (bp)
Controle interno	850
Coronavirus humano OC43	578
Rhinovirus humano A/B/C	394
Vírus sincicial respiratório humano A	269
Vírus influenza A	206
Vírus sincicial respiratório humano B	155
RV15 OneStep ACE Detection (Conjunto C)	Tamanho do produto em gel de agarose (bp)
Controle interno	850
Bocavirus humano 1/2/3/4	579
Vírus influenza B	455
Metapneumovirus humano	351
Parainfluenza vírus humano 4	249
Enterovirus humano	194

FONTE: SEEENE (2015).

Para cada amostra foram utilizados três tubos cônicos de polipropileno (*RNAse free*) de 0,2 mL, cada qual contendo um conjunto de iniciadores para diferentes patógenos. Eles foram nomeados como A, B e C.

Cada amostra foi amplificada simultaneamente em três reações separadas, como mostra a FIGURA 7. O conjunto onde os *primers* para o VSR são encontrados está destacado por um círculo identificado como “Set B”. Também se pode observar na figura um retângulo ao redor da amostra que apresenta banda na posição esperada para o VSR do grupo A (269 pares de base (bp) mais acima e um retângulo ao redor da banda encontrada para o VSR do grupo B (155bp) mais abaixo. O processo inteiro foi feito com os reagentes e amostras em gelo.

FIGURA 7 - MODELOS DE AMPLIFICAÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS UTILIZANDO O KIT DE AMPLIFICAÇÃO *SEEPLEX® RV15 ACE DETECTION* (SEEGENE INC, KOREA)



FONTE: Adaptado de SEEGENE (2015).

O teste foi realizado utilizando os reagentes contidos no kit comercial, da seguinte maneira: Adicionou-se 2,0 µL de 5X RV15 ACE PM (contém os iniciadores do grupo A, B ou C e os controles⁵, em seus respectivos tubos), 3,5 µL 2X *multiplex Master Mix* (contém DNA polimerase, *Buffer* com dNTP's, MgCl₂ e estabilizadores), 1,5 µL 8-MOP *solution*⁶, em seguida o tubo foi homogeneizado rapidamente em vórtex e pulsado em microcentrífuga para retirada das gotas que tenham ficado na tampa. Posteriormente adicionou-se 3 µL da amostra (cDNA alvo) a cada respectivo tubo, totalizando 10 µL. Os tubos foram bem fechados, para evitar evaporação e em seguida foram levados ao termociclador com as seguintes condições de termociclagem: Desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um deles composto de 30 segundos a 94°C para desnaturação do DNA molde, 1 min. e 30 segundos a 60°C para o pareamento dos *primers* e 1 min. e 30 segundos a 72°C para a extensão. No final dos ciclos seguiu-se um aquecimento (72°C) por 10 min. de extensão final, terminando com 10°C até que as amostras fossem retiradas.

Após o término dos ciclos do termociclador, o produto obtido em cada tubo foi verificado por eletroforese em gel de agarose à 1,5% e corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), da seguinte maneira: adicionou-se 5,0 µL da amostra amplificada, 4,0 µL de água ultra-pura e 1,0 µL de tampão de amostra, totalizando 10 µL que foram aplicados no gel. Posteriormente o gel foi fotografado em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) e analisado usando o programa E-capt *Vilber-Lourmat* (OLIVEIRA; MULLER; MEDEIROS, 2010; ICT, S.L., 2012). O controle positivo (RV15 ACE PCR) utilizado vem junto com o kit e contém uma mistura de clones de todos os patógenos contemplados em cada grupo testado (A, B e C) e o controle interno. Em cada reação foi utilizado um controle positivo e um negativo (água ultra-pura).

As amostras positivas para VSR – A ou VSR – B pela técnica de RT-PCR *multiplex* foram submetidas a reações de RT-PCR *duplex* adaptado, visando

⁵ Controle interno foi utilizado para verificar se havia alguma substância que poderia interferir na amplificação da RT-PCR. É composto por um DNA plasmidial.

⁶ 8-MOP (8-methoxypsoralen) foi utilizado para prevenir contaminação, extinguindo a atividade de molde de DNAs contaminantes. É conhecido como intercalante de duplas cadeias de ácidos nucleicos, formando ligações covalentes cruzadas intercadeias depois de ser ativado pela irradiação UV do transiluminador com comprimento de onda entre 320-400nm.

amplificação das regiões que correspondem as glicoproteínas do envelope viral: **G** e **F** (REIS, 2006).

5.4.5 Subtipagem de VSR – Amplificação parcial dos genes G e F.

5.4.5.1 RT- PCR *semi-nested* utilizando o método de Taguchi

Para a realização desta metodologia, alguns parâmetros (variáveis que influenciam a técnica e que podem ser controladas durante o processo) foram testados, como: quantidade de iniciadores, $MgCl_2$, temperatura de anelamento dos iniciadores, quantidade de dNTP's e quantidade de cDNA da amostra, de acordo com a matriz representada no QUADRO 4, onde as linhas representam cada ensaio nas condições propostas pelos níveis (0,1 e 2).

QUADRO 4- VARIÁVEIS UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE TAGUCHI

Variável	A	B	C	D	E
Nível	Concentração dos <i>primers</i>	Quantidade de $MgCl_2$ (100mM)	Temperatura de anelamento	Quantidade de DNA utilizada	Quantidade de Mix dNTP's (10mM)
0	5pmol	0,75µl (1,5mM)	50°C	50ng	1 µl (200 µM)
1	10pmol	2 µl (4mM)	55°C	100ng	2,5 µl (500 µM)
2	20pmol	3 µl (6mM)	65°C	200ng	5 µl (1000 µM)

FONTE: A autora (2015).

Os cinco parâmetros previamente definidos para serem avaliados por esta metodologia (QUADRO 4 e 5) foram analisados com uma mesma amostra, em triplicata, em que foram feitas distintas combinações conforme demonstrado na matriz ortogonal (QUADRO 5), construída pelo *software* JMP, versão 9.0.1 (SAS *Institute* Inc.). Os resultados obtidos (presença de bandas específicas e intensidade destas) foram analisados utilizando o *software E-capt (Vilber-Lourmat)* (OLIVEIRA; MULLER; MEDEIROS, 2010; ICT, S.L., 2012). A matriz obtida substituindo os valores das variáveis, é mostrada no QUADRO 6.

QUADRO 5 - MATRIZ ORTOGONAL SUGERIDA PELA METODOLOGIA DE TAGUCHI, PARA CORRELACIONAR OS PARÂMETROS COM 12 POSSIBILIDADES DE TESTES

VARIÁVEL/ NÍVEL	A	B	C	D	E
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1
3	0	0	0	2	2
4	0	1	2	0	1
5	1	1	1	1	1
6	1	1	1	2	2
7	1	1	1	0	0
8	1	2	0	1	2
9	2	2	2	2	2
10	2	2	2	0	0
11	2	2	2	1	1
12	2	0	1	2	0

FONTE: A autora (2015).

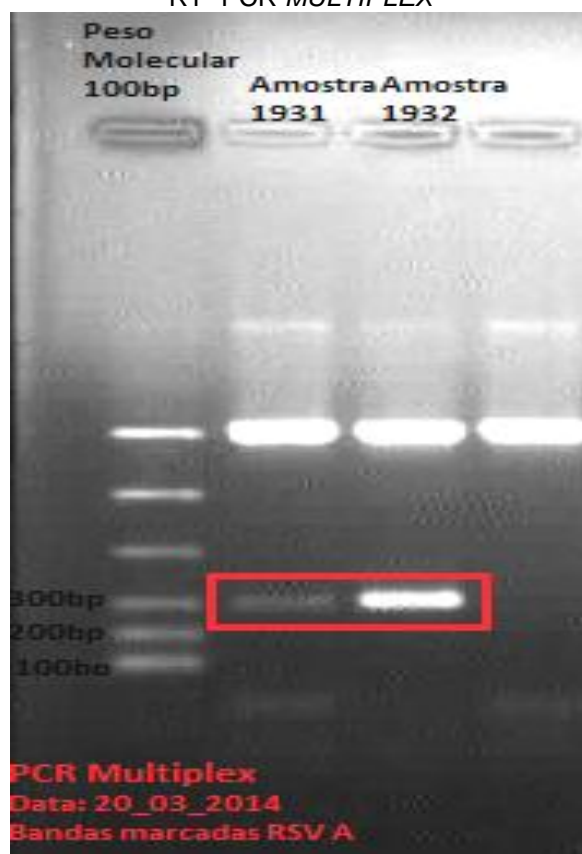
QUADRO 6 - MATRIZ ORTOGONAL OBTIDA APÓS O CRUZAMENTO DAS VARIÁVEIS E SUAS POSSIBILIDADES DE ENSAIO

ENSAIO	A	B	C	D	E
Nível	Concen- tração dos <i>pri- mers</i>	Quantidade de MgCl ₂ (100mM)	Tempera- tura de anela- mento	Quantidade de DNA utilizada	Quantidade de Mix dNTP's (10mM)
1	5pmol	0,75µl (1,5mM)	50°C	50ng	1 µl (200 µM)
2	5pmol	0,75µl (1,5mM)	50°C	100ng	2,5 µl (500 µM)
3	5pmol	0,75µl (1,5mM)	50°C	200ng	5 µl (1000 µM)
4	5pmol	2 µl (4mM)	65°C	50ng	2,5 µl (500 µM)
5	10pmol	2 µl (4mM)	55°C	100ng	2,5 µl (500 µM)
6	10pmol	2 µl (4mM)	55°C	200ng	5 µl (1000 µM)
7	10pmol	2 µl (4mM)	55°C	50ng	1 µl (200 µM)
8	10pmol	3 µl (6mM)	50°C	100ng	5 µl (1000 µM)
9	20pmol	3 µl (6mM)	65°C	200ng	5 µl (1000 µM)
10	20pmol	3 µl (6mM)	65°C	50ng	1 µl (200 µM)
11	20pmol	3 µl (6mM)	65°C	100ng	2,5 µl (500 µM)
12	20pmol	0,75µl (1,5mM)	55°C	200ng	1 µl (200 µM)

FONTE: A autora (2015).

Utilizou-se uma amostra positiva para VSR do grupo A (amostra 1932), do ano de 2013 para que todos os testes fossem realizados, de acordo com os parâmetros sugeridos pelo QUADRO 6, em triplicata. Essa amostra foi selecionada, tendo como base o resultado obtido através da eletroforese feita a partir do RT-PCR *multiplex*, optando-se pela banda que apresentava maior intensidade e resolução para o VSR, como mostra a FIGURA 8, onde estão destacadas por um retângulo duas bandas, mostrando a diferença de intensidade entre elas.

FIGURA 8 - BANDAS OBTIDAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM PRODUTOS DA RT-PCR *MULTIPLEX*



FONTE: A autora (2015).

A amostra extraída continha concentração de material genético (RNA) no valor de 43 ng/μL na primeira extração, e na segunda, concentração de 53 ng/μL. A enzima utilizada para fazer os ensaios foi a DFS-Taq DNA *Polymerase* – *Bioron International* (www.bioron.net).

Para o cálculo das concentrações otimizadas, foram analisados todos os resultados obtidos das reações de RT-PCR *semi-nested*, que foram realizadas, conforme a matriz ortogonal previamente descrita no QUADRO 6.

A análise no *software E-capt (Vilber-Lourmat)*, consiste na observação da presença do produto obtido através da eletroforese em gel de agarose, contendo a banda do tamanho esperado, em bp e área, partindo do princípio de que a melhor reação de RT-PCR é aquela que obtém a maior concentração de produto (*“larger-better”*). Os valores obtidos pelo cálculo da área foram aplicados em uma fórmula (FIGURA 9) desenvolvida para essa padronização, de acordo com seu idealizador, Taguchi (COBB; CLARKSON, 1994).

FIGURA 9 - FÓRMULA RECOMENDADA POR TAGUCHI

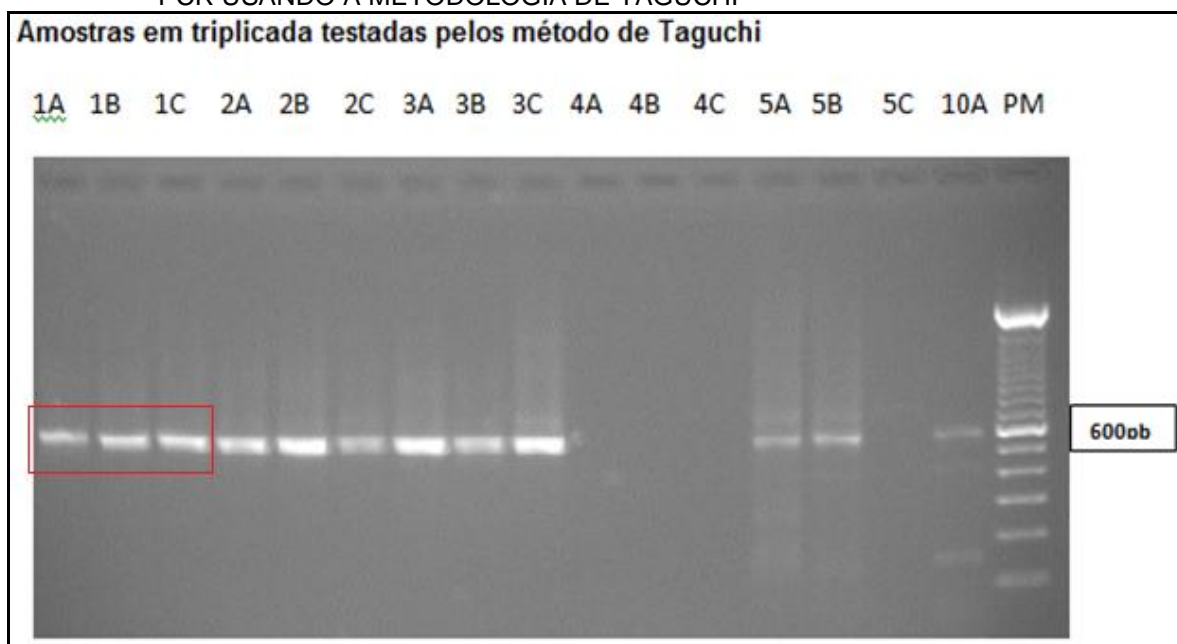
$$SNL = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right)$$

FONTE: COBB; CLARKSON (1994).

Onde, **SN_L** é a razão sinal-ruído, **n** é o número de níveis e **y** é o rendimento. Para cada componente, as condições ótimas são aquelas que **SN_L** é maior, dessa forma, deseja-se maximizar os resultados.

Após a realização dos 12 tipos de ensaios, em triplicata, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e as bandas observadas foram analisadas de acordo com o tamanho da área do respectivo produto (FIGURA 10).

FIGURA 10 - IMAGEM DO GEL DE ELETROFORESE UTILIZADO PARA PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR USANDO A METODOLOGIA DE TAGUCHI



FONTE: A autora (2015).

Posteriormente a esse processo, o resultado dos valores mais adequados para que a reação de RT-PCR fosse feita, de forma que utilizasse menores quantidades de reagentes e que apresentasse uma intensidade e resoluções fáceis de identificar na eletroforese, foram aqueles valores empregados no ensaio de número 1 (FIGURA 10), que apresentava os seguintes parâmetros, de acordo com o QUADRO 7 . O protocolo de trabalho utilizando esses valores encontra-se no APÊNDICE 1.

QUADRO 7- MELHORES PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RT-PCR E *SEMI-NESTED* PCR, DE ACORDO COM O RESULTADO DA PADRONIZAÇÃO PELA METODOLOGIA DE TAGUCHI

1° PCR (50°C)		Semi-nested PCR (50°C)	
REAGENTE	VOLUME	REAGENTE	VOLUME
<i>Buffer</i>	5 µL	<i>Buffer</i>	5 µL
MgCl ₂ (100mM)	0,75 µL (1,5mM)	MgCl ₂	0,75 µL
dNTP's (10mM)	1 µL (200 µM)	dNTP's	1 µL
<i>Primer GAB (+)</i> (10pmol)	0,5 µL (5pmol)	<i>Primer GAB (+)</i>	0,5 µL
<i>Primer FV (-)</i> (10pmol)	0,5 µL (5pmol)	<i>Primer F1AB (-)</i>	0,5 µL
Enzima Taq	0,5 µL	Enzima Taq	0,5 µL
H ₂ O qsp	40,55 µL	H ₂ O qsp	38,75 µL
cDNA (Concentração da amostra: 43 ng/µL)	1,2 µL (50 ng/µL)	cDNA	3 µL
TOTAL	50 µL	TOTAL	50 µL

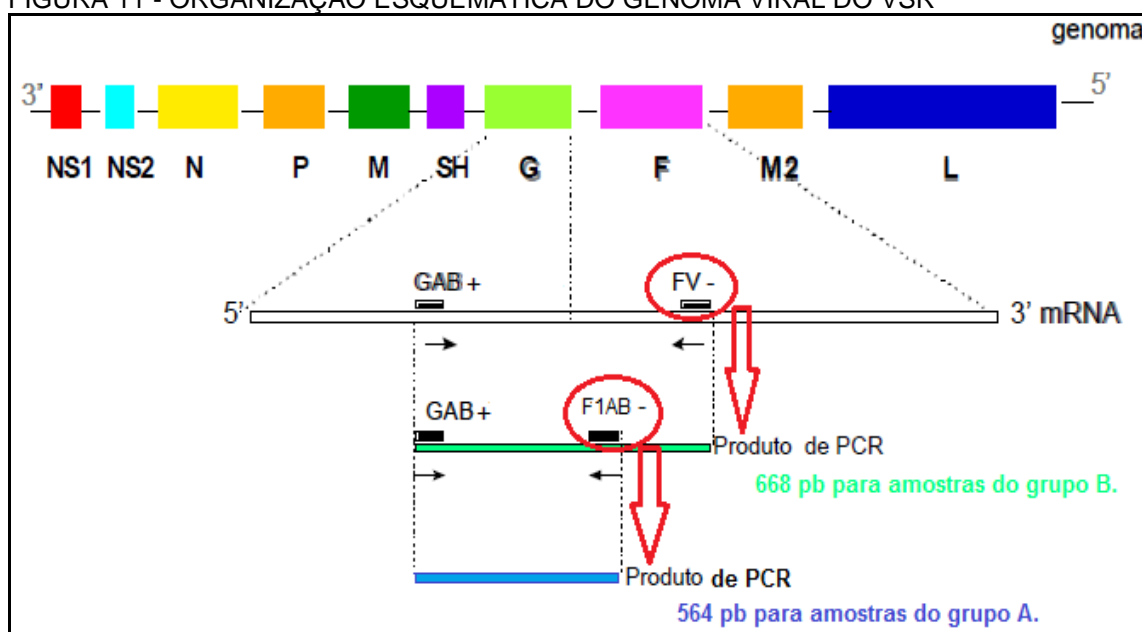
FONTE: A autora (2015).

5.4.5.2 RT- PCR *duplex* adaptado

Com os resultados obtidos utilizando-se a metodologia de Taguchi, iniciou-se a realização da técnica de RT-PCR convencional, aplicando uma metodologia *semi-nested*, utilizando as concentrações otimizadas. Como houve baixa positividade das amostras analisadas, optou-se por realizar nova padronização da técnica, passando a utilizar uma metodologia de RT- PCR convencional *duplex*.

Empregou-se essa metodologia para que os genes que codificam as glicoproteínas do envelope viral **G** e **F**, que são as mais variáveis, fossem amplificados. Pode ser observado na FIGURA 11, a localização dos genes que codificam as proteínas de interesse e em destaque, os iniciadores que foram utilizados e os tamanhos esperados para os produtos amplificados, de acordo com o grupo ao qual pertencem. No QUADRO 8, observam-se a relação dos *primers* utilizados.

FIGURA 11 - ORGANIZAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA VIRAL DO VSR



FONTE: Adaptado de REIS (2006).

QUADRO 8- RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA TÉCNICA DE RT-PCR, MOSTRANDO SUA ESPECIFICIDADE PARA O GRUPO A E/OU GRUPO B, POLARIDADE, LOCALIZAÇÃO, SEQUÊNCIA E TAMANHO DO PRODUTO ESPERADO.

UTILIZAÇÃO	POLARIDADE	LOCALIZAÇÃO	PRIMER (SEQUENCIA 5' - 3')	PRODUTO
Detecção de RSV A/B	GAB (+)	5100 – 5119 gp G	YCAYTTTGAAGTGTTCACCTT (21bp)	
Detecção do grupo A	F1AB (-)	5664 – 5645 gp F	CAACTCCATTGTTATTGCC (20bp)	RSVA = 564pb
Detecção do grupo B	FV (-)	5768 – 5747 gp F	GTTATGACACTGGTATACCAAC (22bp)	RSVB = 668pb

FONTE: Adaptado de REIS (2006).

A metodologia foi realizada de acordo com o que foi estabelecido na padronização pelo método de Taguchi.

Para um volume de reação final de 50 μ L, utilizou-se: **5 μ L** de *reaction buffer* (x 10) “incomplete”; **0,75 μ L** (equivalente a 1,5 mM) de $MgCl_2$ (concentração 100 mM); **1,0 μ L** (equivalente a 200 μ M) de mix de *dNTP*’s (concentração 10 mM cada); **0,5 μ L** do *primer forward* (GAB+) e dos *primers reverse* (FV- e F1AB-) na concentração 10 μ M cada; **0,5 μ L** de enzima DFS-Taq DNA *Polymerase*; quantidade suficiente para (q.s.p) 50 μ L, de água ultra-pura que é variável de acordo com a quantidade de material genético adicionado à reação e volume proporcional à 50 ng de molde de DNA.

Em seguida, o tubo contendo os reagentes e o molde de DNA foi levado ao termociclador para a amplificação, com as seguintes condições de termociclagem:

Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um deles composto de 15 segundos a 94°C para desnaturação do DNA molde, 30 segundos a 50°C para o pareamento dos *primers* e 30 segundos a 72°C para a extensão. No final dos ciclos seguiu-se um aquecimento (72°C) por 7 min. de extensão final. Todas as reações realizadas incluíram controles negativos (água ultra-pura) e um controle positivo para VSR do grupo A, para validar o processo de amplificação e identificar a presença de contaminantes.

5.4.5.3 Eletroforese em gel de agarose

A detecção do produto amplificado foi realizada em gel de agarose a 1,5% (REIS, 2006) em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) (1x) contendo 0,1 µL de corante SYBR® Safe DNA Gel Stain⁷ para cada mL de tampão TBE utilizado. Após a polimerização do gel, foram aplicados 7 µL o produto da RT-PCR, misturado com 3 µL de tampão de amostra (carreador) (contém 50 mM de EDTA pH 8,0; 25% de Ficoll e 0,25% de azul de bromofenol), totalizando 10 µL. No primeiro poço do gel foi adicionado 10 µL do peso molecular (*GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* - Fermentas), diluído de acordo com a recomendação do fabricante.

Os parâmetros da corrida incluíram a voltagem de 110 volts, com tempo aproximado de 60 minutos, dependendo do tamanho da cuba de eletroforese. Em seguida, o gel foi visualizado no transiluminador *Vilber Lourmat*, sob luz ultravioleta, para detecção das bandas. Posteriormente a imagem obtida foi analisada e a densitometria das bandas do gel de eletroforese foram realizadas com o *software* E-capt (*Vilber Lourmat*) (OLIVEIRA; MULLER; MEDEIROS, 2010; ICT, S.L., 2012).

As amostras que apresentaram sinais compatíveis com a amplificação destas regiões (amplicons) foram purificadas e analisadas por sequenciamento nucleotídico.

5.4.6 Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos da RT-PCR é necessária para remoção do excesso de *dNTP's* e *primers* que podem interferir na reação de sequenciamento. As

⁷ No decorrer das análises, o corante SYBR® Safe foi substituído por 0,05 µL de brometo de etídeo para cada mL de TBE utilizado.

amostras que apresentaram bandas consideradas dentro do valor dos pares de bases esperados para o VSR (aproximadamente 564 pb para o grupo A e 668 pb para o grupo B), foram purificadas utilizando o kit *PureLink® Quick Gel Extraction* da marca *Invitrogen™*, de acordo com o recomendado pelo fabricante. Posteriormente o material purificado (DNA) foi dosado em espectrofotômetro Thermo Scientific® – *NanoDrop 2000 - Uniscience* para verificar a concentração e pureza a 260 nm e pela razão 260/280 nm, respectivamente. O material foi armazenado em freezer a – 80°C.

5.4.7 Reação de sequenciamento para marcação do DNA

Após a purificação e quantificação, o produto de PCR obtido foi submetido à técnica de sequenciamento nucleotídico. Utilizou-se o kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standard* (*Applied Biosystems Division, Foster City, CA*), com os seguintes reagentes: 1 µL de *Premix ready reaction*, 1,5 µL de tampão de sequenciamento, volume de molde de DNA calculado de acordo com o recomendado pelo fabricante (TABELA 2), 1 µL de *primer* (5 pmol/µL)⁸, água ultra-pura em q.s.p completar 10 µL. Como o VSR apresenta fragmentos de aproximadamente 600 bp, utiliza-se 30 ng de material genético.

Em seguida, o tubo contendo os reagentes e o molde de DNA foi levado ao termociclador para a marcação do DNA, com as seguintes condições de termociclagem: Desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos, cada um deles composto de 15 segundos a 96°C para desnaturação do DNA molde, 15 segundos a 50°C para o pareamento dos *primers* e 4 minutos a 60°C para a extensão. No final dos ciclos pode-se deixar o equipamento em 4°C até o momento da retirada dos tubos.

⁸ Deve ser feita uma reação de sequenciamento para cada *primer*.

TABELA 2 - QUANTIDADE DE DNA MOLDE A SER UTILIZADO EM REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO, DE ACORDO COM O TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO

Molde	Quantidade
Produto de PCR	
100-200pb	10ng
200-500pb	20ng
500-1000pb	30ng
>1000pb	100ng
DNA de cadeia simples	100ng
Plasmídeo	255ng
>10000pb	1µg

FONTE: Kit BIG DYE TERMINATOR v3.1 Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

5.4.8 Purificação e precipitação do DNA marcado

Este processo tem o objetivo de remover o excesso de didesoxinucleotídeos presentes na reação, através do método de precipitação com isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol 70%.

O processo consistiu em adicionar 40 µL de isopropanol 75% ao material genético que foi marcado, homogeneizando-o logo em seguida. Deixou-se em temperatura ambiente por 20 minutos, protegendo o material da incidência da luz. Centrifugou-se a 1610 x g por 45 min. (Centrífuga *Eppendorf 5430*), as amostras contidas em placa ou 11387 x g por 30 min. (Centrífuga *Eppendorf MiniSpin®*), caso estivessem em tubo cônico de polipropileno (*RNAse free*) de 0,5 mL. Removeu-se o isopropanol invertendo a placa/tubo sobre um papel absorvente. Em seguida foi adicionado lentamente pelas paredes do tubo/ poço, 200 µL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se a 1610 x g por 10 min. (Centrífuga *Eppendorf 5430*), se fosse placa ou 11387 x g por 10 min. (Centrífuga *Eppendorf MiniSpin®*), se estivesse usando tubo. O etanol foi removido invertendo-se a placa/tubo sobre um papel absorvente. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por aproximadamente 12 horas, para que todo o etanol evaporasse.

Em seguida, as amostras foram precipitadas da seguinte maneira: Adicionou-se 10 µL de formamida HI-DI e em seguida o tubo/placa foi levado ao termociclador a 96°C por 5 minutos. Após esse processo, o material ficou em gelo até ser levado ao sequenciador. Os materiais foram submetidos à eletroforese em polímero POP-7, utilizando o sequenciador automático modelo 3500xl *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems*, Inc. EUA.

5.4.9 Análise filogenética

Após o sequenciamento, os fragmentos foram editados utilizando os programas *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.2.5 (12/11/2013) e *SeqMan®*, *Lasergene* versão 7.0.0 (*DNASTAR*, Inc, Madison, WI. 24/01/2006) com a formação das sequências-consenso (*contigs*). Posteriormente com o software MEGA, versão 6.06 – *Expert Analysis Software* – *DNASTar*, Inc. EUA, foi realizado o alinhamento das sequências obtidas de acordo com o programa *Clustal W* e a construção das árvores filogenéticas foram baseadas no método de *Maximum Likelihood*, utilizando análise de bootstrap com 500 repetições (TAMURA *et al.*, 2011). As sequências obtidas foram alinhadas com referências de sequências virais obtidas no banco de dados do *GenBank*, conforme QUADROS 9 e 10.

QUADRO 9 - REFERÊNCIAS DO GRUPO A DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA (**Continua**)

Grupo A			
Genótipo	Cepa	Origem	Código
GA1	NY108	New York- USA	AF233917
	MO48	Missouri - USA	AF233914
GA2	CH57	Atlanta – USA	AF065258
	CH28	Atlanta – USA	AF065256
GA3	TX68481	Texas – USA	AF233920
	MO16	Missouri - USA	AF233913
GA4	CH09	Atlanta – USA	AF065254
	NZA-89-03	New Zealand	DQ171789
GA5	AL19556-3	Alabama - USA	AF233903
	CH17	Atlanta – USA	AF065255
GA6	NY20	New York - USA	AF233918
	AL19452-2	Alabama - USA	AF233901
GA7	MO02	Missouri - USA	AF233910
	CN1973	Manitoba - Canada	AF233904

QUADRO 9 - REFERÊNCIAS DO GRUPO A DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA **(Conclusão)**

Grupo A			
Genótipo	Cepa	Origem	Código
NA1	UPM/A/09	Malaysia	JQ933950
	BR-CE-374-2008	Fortaleza – BR	JX513381
NA2	BR-CE-395-2011	Fortaleza – BR	JX513386
SAA1	SA97D669	Soweto - South Africa	AF348809
ON1	ON67-1210a	Ontário - Canadá	JN257693
	10162AN/2012	Ancona – Itália	JX988439
	USA/LA2_56	Tennessee - USA	KM042392
Cepa padrão do grupo A = <i>Long</i> (AY911262) A2 (JX198138)			

FONTE: NCBI (2015).

QUADRO 10 - REFERÊNCIAS DO GRUPO B DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA **(Continua)**

Grupo B			
Genótipo	Cepa	Origem	Código
BA	BA/1370/99	Argentina	DQ227364
BA1	BA3833/99B	Madrid – Espanha	AY333362
BA2	BA/1161/02	Argentina	DQ227377
	BA/5140/03	Argentina	DQ227393
BA3	BA/4915/03	Argentina	DQ227390
	BA/1607/04	Argentina	DQ227397
BA4	BJ/23654	Beijing – China	KC297457
	B/RJ/445/2010	Brazil	JX908876
BA5	NG-137-02	Niigata – Japão	AB603481
BA6	BE/11508/01	Belgium	AY751116
	BE/11500/01	Belgium	AY751105
BA7	BE/13457/03	Belgium	AY751087
BA8	NG-228-06	Niigata – Japão	HM459871
BA9	HR 144-13	Croatia	KJ173834
BA10	SA01-00055	Johannesburg - South Africa	KC476920
GB1	CH10b	Atlanta - USA	AF065250
	USA/89I-132A-01	New York - USA	KJ723482
GB2	CH93-9B	Atlanta – USA	AF065251
GB3	BR/RJ/188/2007	Brazil	JX908832
GB3/SAB3	BR/A-32/04	Campinas – BR	FJ804093
GB4	MO30	Missouri – USA	AF233928
SAB1	SA0025	Soweto - South Africa	AF348825
SAB2	SA99V800	Soweto - South Africa	AF348821
SAB3	BR133-1999	São Paulo – BR	EU582398

QUADRO 10 - REFERÊNCIAS DO GRUPO B DO VSR UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA (**Conclusão**)

Grupo B			
Genótipo	Cepa	Origem	Código
SAB4	BR-CE-245-2005	Fortaleza – BR	JX489439
	BR-CE-193-2005	Fortaleza – BR	JX489422
URU-1	MON/7/01	Montevideo – Uruguay	AY488804
URU-2	MON/9/01	Montevideo – Uruguay	AY488806
Cepa padrão do grupo B = CH18537 - (M17213) Sw8/ 1960 (N73545)			

FONTE: NCBI (2015).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio de cálculos de medidas de tendência central de dispersão, sendo expressos em médias e desvio padrão para as variáveis contínuas de distribuição simétrica e em medianas e intervalos interquartis (IQR) para as de distribuição assimétrica. Análise univariada foi realizada para todas as variáveis. Teste exato de *Fisher*, qui-quadrado de *Pearson*, teste t de *Student* e teste de *Mann-Whitney* foram realizados, quando apropriados. Para todos os testes foi considerado um nível mínimo de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS

No período de julho de 2011 a maio de 2013, foram analisadas 978 amostras respiratórias (ANF ou BAL) recebidas pelo laboratório de virologia do HC-UFPR, com solicitação para pesquisa de vírus respiratórios. Dessas, 360 (36,8%) foram negativas e houve a detecção de vírus respiratórios, de acordo com o espectro do kit utilizado de RT-PCR *multiplex* (RV 15) em 600 (61,4%) amostras.

Das amostras positivas, 176 (176/600, 29,3%) apresentaram detecção de mais de um vírus e a maioria, 424 (70,7%) amostras, eram de monoinfecção viral.

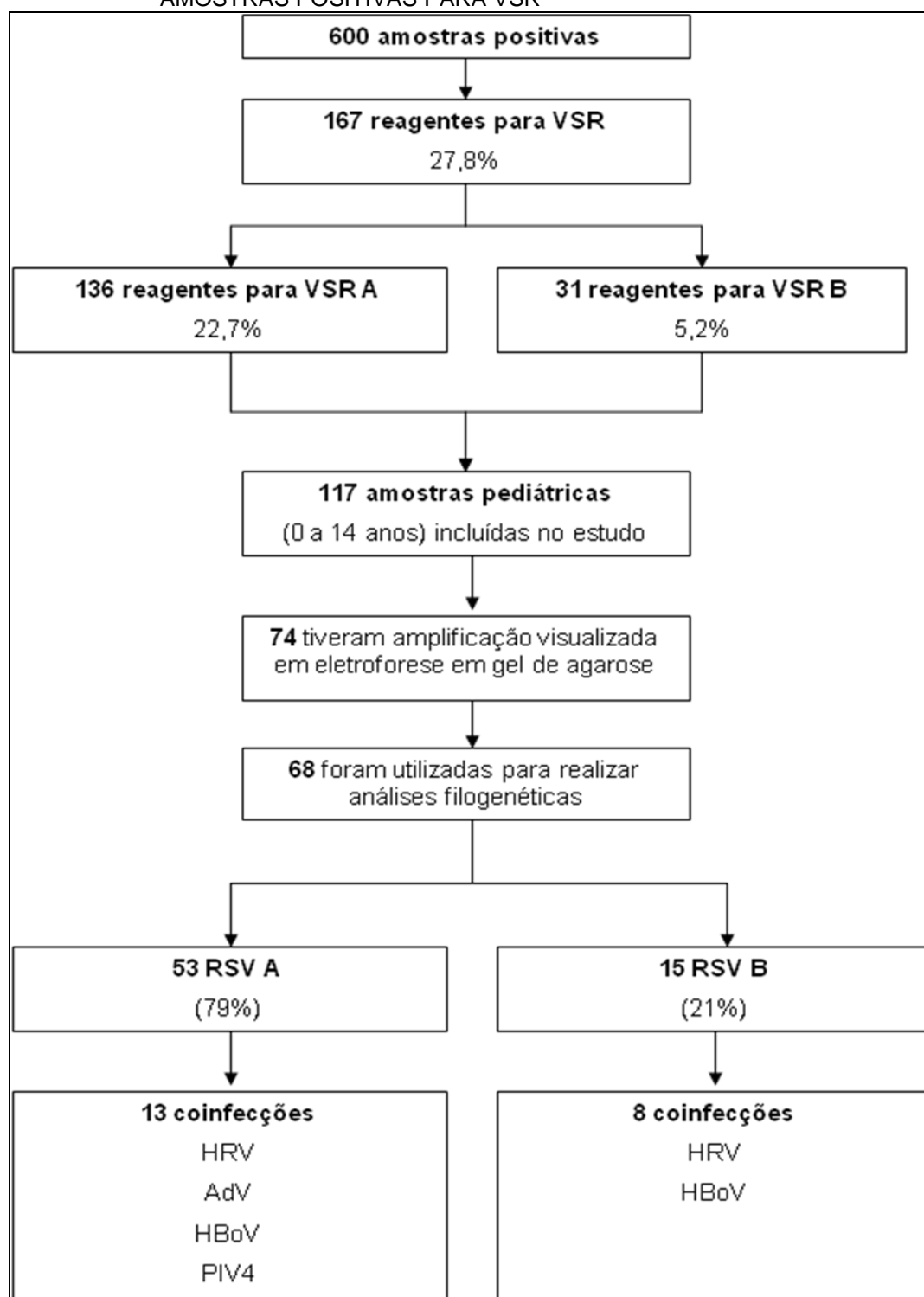
Dentre as coinfeções (176 amostras), os vírus mais detectados foram: rinovirus, enterovirus, VSR e adenovirus.

O VSR foi detectado em 167 (167/600, 27,8%) amostras, sendo a maioria 136 (136/600, 22,7%) pertencente ao grupo A e 31 (31/600, 5,2%) amostras foram do grupo B.

Das 167 amostras positivas para VSR, detectadas durante o período de estudo, 20 foram de 2011, 66 de 2012 e 81 de 2013. Destas, 117 amostras apresentavam os critérios de inclusão para a participação do estudo e foram selecionadas para a amplificação parcial dos genes G e F pelo método de RT-PCR *duplex*, sendo testadas: 14 amostras de 2011, 43 de 2012 e 60 de 2013.

Em 63% (74/117) das amostras testadas por RT-PCR *duplex*, conseguiu-se a amplificação de um produto específico, o qual foi purificado e analisado pela técnica de sequenciamento nucleotídico. Destas, 68 (68/117, 58%) amostras obtiveram sequências de boa qualidade para a realização das análises filogenéticas. Esquema de trabalho demonstrado na FIGURA 12.

FIGURA 12 - FLUXO DE TRABALHO E RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA VSR



FONTE: A autora (2015).

6.2 DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS

Foram revisados 70 prontuários dentre os pacientes pediátricos selecionados para a pesquisa. Observou-se que a mediana de idade dos pacientes estudados foi de 6 meses (IQR 2; 11 meses), com predomínio do sexo feminino (54,3%).

A maioria dos pacientes com VSR foi internada em enfermaria (87,1%) e as manifestações clínicas mais frequentes foram: esforço respiratório (90%), febre (72,9%) e hipoxemia (95,7%). Em 88,6% dos casos, não houve a necessidade do uso de ventilação mecânica invasiva.

A mediana do tempo de internamento foi de 5 dias (IQR 4; 8 dias). Em relação ao número de dias de uso de oxigênio também se encontrou uma mediana de 5 dias (IQR 3; 7 dias).

Os diagnósticos mais frequentes entre os pacientes hospitalizados com VSR foram: bronquiolite, traqueobronquite e pneumonia viral, com 38,6%, 28,6% e 15,7% respectivamente.

A maior parte desses pacientes apresentou infecção apenas pelo VSR (68,6%). Nos casos onde houve coinfeção viral (22/70, 31%), o vírus mais frequente associado ao VSR foi o HRV, em 12 dos 22 casos.

Com relação aos dados laboratoriais, o número de leucócitos presentes no hemograma no momento da internação, apresentou mediana de $10315,0 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (IQR: $7973,0$; $14598,0 \cdot 10^3/\mu\text{L}$). Em relação a proteína C reativa, a mediana foi de $0,84 \text{ mg/dL}$ (IQR: $0,33$; $2,2 \text{ mg/dL}$). Pode-se considerar como valores de referência para crianças de 1 a 23 meses, o valor de $6000,0$ a $14000,0 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ leucócitos e valores menores que $0,5 \text{ mg/dL}$ para proteína C reativa (FERREIRA *et al.*, 2005).

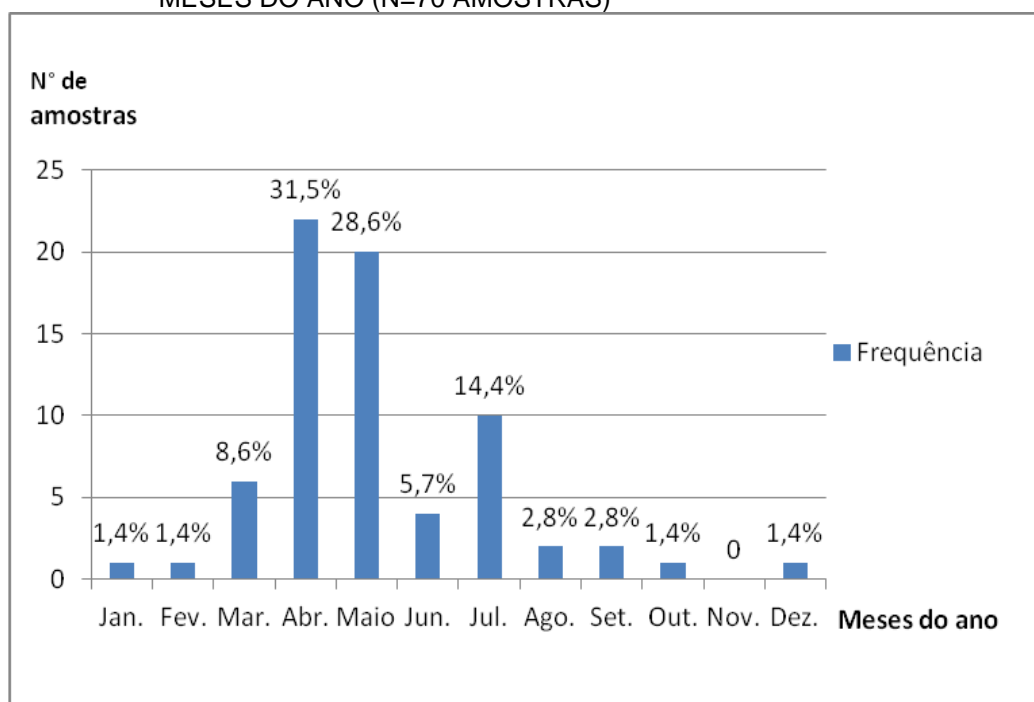
Considerando os fatores de risco, constatou-se que 84,3% não apresentavam doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), 74,3% não possuíam história familiar de asma e 77,1% não exibiam história pessoal de atopia. Em relação ao tabagismo passivo, 8,6% dos prontuários analisados não continham essa informação e as porcentagens das crianças expostas à fumaça do cigarro foram de 51,4% e as não expostas de 40%. A idade gestacional ao nascimento apresentou mediana de 38 semanas (IQR: 37; 39). Quanto ao número de internamentos prévios por quadro respiratório, a maioria (75,7%) não tinha histórico de internamento prévio. Um total de 57,1% dos pacientes utilizou antibiótico na vigência desta infecção.

Na análise dos 70 prontuários, verificou-se que uma paciente evoluiu para o óbito, porém ela apresentava atresia intestinal e já havia feito várias cirurgias para correção dessa patologia. Durante uma dessas internações, a paciente adquiriu a infecção por VSR, mas essa infecção não foi relacionada como causa da morte.

6.3 SAZONALIDADE

Com relação à sazonalidade das infecções por VSR no período de estudo, os meses de abril, maio e julho (outono e inverno), foram aqueles em que houve mais casos de infecção por VSR, apresentando frequências de 31,5%, 28,6% e 14,4% das infecções respectivamente (FIGURA 13).

FIGURA 13 - INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS POR VSR DE ACORDO COM OS MESES DO ANO (N=70 AMOSTRAS)



FONTE: A autora (2015).

6.4 COMPARAÇÕES ENTRE PACIENTES INFECTADOS PELO VSR GRUPO A E GRUPO B

Não foi observada diferença significativa entre os grupos A e B do VSR com relação às variáveis demográficas e clínicas avaliadas. Observou-se apenas uma tendência de ter um maior número de coinfeções entre os pacientes infectados pelo VSR do grupo B (TABELAS 3 e 4).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS NOS CASOS DE INFECÇÃO PELO VSR DO GRUPO A E VSR DO GRUPO B

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	GRUPO A N= 55 (%)	GRUPO B N= 15 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Gênero				
Masculino	23 (41,8%)	9 (60,0%)	32 (45,7%)	0,2512
Feminino	32 (58,2%)	6 (40,0%)	38 (54,3%)	
Idade (em meses)				
Mediana	5	7	6	0,3286
IQR*	(2 ;11)	(4 ; 10,5)	(2 ; 11)	
Idade gestacional (em semanas)				
≥ 37	43 (78,2%)	11 (73,3%)	54 (77,1%)	0,2931
< 37	12 (21,8%)	4 (26,7%)	16 (22,9%)	
Histórico familiar de asma				
Sim	16 (29,1%)	2 (13,3%)	18 (25,7%)	0,3225
Não	39 (70,9%)	13 (86,7%)	52 (74,3%)	
História pessoal de atopia				
Sim	11 (20,0%)	5 (33,3%)	16 (22,9%)	0,3080
Não	44 (80,0%)	10 (66,7%)	54 (77,1%)	
Presença de DPOC*				
Sim	10 (18,2%)	1 (6,7%)	11 (15,7%)	0,4354
Não	45 (81,8%)	14 (93,3%)	59 (84,3%)	
Nº de internamentos prévios por quadro respiratório				
Nenhum	42 (76,4%)	11 (73,3%)	53 (75,7%)	0,7264
≥ 1	11 (20,0%)	4 (26,7%)	15 (21,4%)	
NI*	2 (3,6%)	0	2 (2,9)	
Tabagismo passivo				
Sim	22 (40,0%)	6 (40,0%)	28 (40,0%)	0,7754
Não	27 (49,1%)	9 (60,0%)	36 (51,4%)	
NI*	6 (10,9%)	0	6 (8,6%)	

LEGENDA: *DPOC= Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; IQR= intervalo interquartil; NI= não informado.

FONTE: A autora (2015).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE INFECÇÃO PELO VSR DO GRUPO A E VSR DO GRUPO B (Continua)

VARIÁVEIS CLÍNICAS e LABORATORIAIS	GRUPO A N= 55 (%)	GRUPO B N= 15 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Local de internação				
Enfermaria	49 (89,1%)	12 (80,0%)	61 (87,1%)	0,3915
UTI*	6 (10,9%)	3 (20,0%)	9 (12,9%)	
Diagnóstico				
Bronquiolite	21 (38,2%)	6 (40,0%)	27 (38,6%)	NA*
Traqueobronquite	16 (29,1%)	4 (26,6%)	20 (28,6%)	
Pneumonia viral	9 (16,4%)	2 (13,3%)	11 (15,7%)	
Pneumonia bacteriana	6 (10,9%)	1 (6,7%)	7 (10,0%)	
Laringite	2 (3,6%)	1 (6,7%)	3 (4,3%)	
Apneia	1 (1,8%)	1 (6,7%)	2 (2,8%)	
Tipo de infecção				
Monoinfecção	41 (74,5%)	7 (46,7%)	48 (68,6%)	0,0591
Coinfecção	14 (25,5%)	8 (53,3%)	22 (31,4%)	
Tempo de internamento (em dias)				
Mediana	5	6	5	0,8967
IQR*	(4 ; 8)	(3 ; 8,5)	(4 ; 8)	
Necessidade de oxigênio				
Sim	54 (98,2%)	13 (86,7%)	67 (95,7%)	0,1138
Não	1 (1,8%)	2 (13,3%)	3 (4,3%)	
Necessidade de ventilação mecânica				
Sim	5 (9,1%)	3 (20,0%)	8 (11,4%)	0,3551
Não	50 (90,9%)	12 (80,0%)	62 (88,6%)	
Nº de dias de uso de oxigênio				
Mediana	5	5	5	0,4497
IQR*	(3 ; 7)	(2 ; 6)	(3 ; 7)	
Febre				
Sim	39 (70,9%)	12 (80,0%)	51 (72,9%)	0,7441
Não	16 (29,1%)	3 (20,0%)	19 (27,1%)	
Esforço respiratório				
Sim	49 (89,1%)	14 (93,3%)	63 (90,0%)	1,000
Não	6 (10,9%)	1 (6,7%)	7 (10,0%)	
Valor da proteína C reativa (mg/dL)				
Mediana	0,74	1,01	0,84	0,9276
IQR*	(<0,33 ; 2,21)	(0,46 ; 1,40)	(<0,33 ; 2,21)	
NI*	16 (29,1%)	3 (20,0%)	19 (27,1%)	
Nº total de leucócitos (.10³/µL)				
Mediana	10.020	11.910	10.315	0,7528
IQR*	(8.225 ; 15.445)	(6.915 ; 14.045)	(7.973 ; 14.598)	
Uso de antibiótico				
Sim	32 (58,2%)	8 (53,3%)	40 (57,1%)	0,7750
Não	23 (41,8%)	7 (46,7%)	30 (42,9%)	

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE INFECÇÃO PELO VSR DO GRUPO A E PELO VSR DO GRUPO B (**Conclusão**)

VARIÁVEIS CLÍNICAS e LABORATORIAIS	GRUPO A N= 55 (%)	GRUPO B N= 15 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Evolução Clínica				
Alta hospitalar	54 (98,2%)	15 (100%)	69 (98,6)	NA*
Óbito	1 (1,8%)	0	1 (1,4%)	
Doença grave				
Sim	12 (21,8%)	6 (40,0%)	18 (25,7%)	0,2707
Não	43 (78,2%)	9 (60,0%)	52 (74,3%)	

LEGENDA: **IQR**= intervalo interquartil; **NA**= não aplicável; **NI**= não informado; **UTI**= unidade de terapia intensiva.

FONTE: A autora (2015).

6.5 COMPARAÇÕES ENTRE PACIENTES MONO E COINFECTADOS PELO VSR

Também foi realizada comparação entre os pacientes que apresentavam infecção apenas pelo VSR e aqueles que apresentavam coinfecção viral. Observou-se que houve diferença significativa entre a distribuição dos casos por sexo e com relação a internamentos prévios, com a maior frequência de coinfeções virais nos pacientes femininos e indivíduos com relato de mais de um internamento. Por outro lado, houve um predomínio de casos de monoinfecção em pacientes de menor idade. Em relação aos dados clínicos, observou-se que a presença de febre era mais frequente nos pacientes coinfectados e houve uma tendência dos monoinfectados estarem com o vírus pertencente ao grupo A (TABELAS 5 e 6).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFEÇÃO COM O VSR (**Continua**)

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	MONOINFECÇÃO N= 48 (%)	COINFEÇÃO N= 22 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Gênero				
Masculino	26 (54,2%)	6 (27,3%)	32 (45,7%)	0,0425
Feminino	22 (45,8%)	16 (72,7%)	38 (54,3%)	
Idade (em meses)				
Mediana	4	8,5	6	0,0335
IQR*	(2 ; 9,3)	(4,8 ;12,5)	(2 ; 11)	
Idade gestacional (em semanas)				
≥ 37	36 (75,0%)	18 (81,8%)	54 (771%)	0,3227
< 37	12 (25,0%)	4 (18,2%)	16 (22,9%)	

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFECÇÃO COM O VSR (**Conclusão**)

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	MONOINFECÇÃO N= 48 (%)	COINFECÇÃO N= 22 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Histórico familiar de asma				
Sim	13 (27,1%)	5 (22,7%)	18 (25,7%)	0,7759
Não	35 (72,9%)	17 (77,3%)	52 (74,3%)	
História pessoal de atopia				
Sim	9 (18,8%)	7 (31,8%)	16 (22,9%)	0,2380
Não	39 (81,2%)	15 (68,2%)	54 (77,1%)	
Presença de DPOC*				
Sim	7 (14,6%)	5 (22,7%)	12 (17,1%)	0,4978
Não	41 (85,4%)	17 (77,3%)	58 (82,9%)	
Nº de internamentos prévios por quadro respiratório				
Nenhum	41 (85,4%)	12 (54,5%)	53 (75,7%)	0,0288
≥ 1	7 (14,6%)	8 (36,4%)	15 (21,4%)	
NI*	0	2 (9,1%)	2 (2,9%)	
Tabagismo Passivo				
Sim	21 (43,8%)	7 (31,8%)	28 (40,0%)	0,4202
Não	23 (47,9%)	13 (59,1%)	36 (51,4%)	
NI*	4 (8,3%)	2 (9,1%)	6 (8,6%)	

LEGENDA: *DPOC= Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; IQR= intervalo interquartil; NI= não informado.

FONTE: A autora (2015).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFECÇÃO COM O VSR (**Continua**)

VARIÁVEIS CLÍNICAS e LABORATORIAIS	MONOINFECÇÃO N= 48 (%)	COINFECÇÃO N= 22 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Local de internação				
Enfermaria	44 (91,7%)	17 (77,3%)	61 (87,1%)	0,1276
UTI*	4 (8,3%)	5 (22,7%)	9 (12,9%)	
Diagnóstico				
Bronquiolite	18 (37,5%)	9 (40,9%)	27 (38,6%)	NA*
Traqueobronquite	13 (27,1%)	7 (31,8%)	20 (28,6%)	
Pneumonia viral	9 (18,7%)	2 (9,1%)	11 (15,7%)	
Pneumonia bacteriana	5 (10,4%)	2 (9,1%)	7 (10,0%)	
Laringite	3 (6,3%)	0	3 (4,3%)	
Apneia	0	2 (9,1%)	2 (2,8%)	
Tipo de infecção				
Grupo A	41 (85,4%)	14 (63,6%)	55 (78,6%)	0,0591
Grupo B	7 (14,6%)	8 (36,4%)	15 (21,4%)	
Tempo de internamento (em dias)				
Mediana	5	6	5	0,5088
IQR*	(4 ; 7,3)	(4 ; 9,8)	(4 ; 8)	

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS CASOS DE MONOINFECÇÃO PELO VSR E COINFECÇÃO COM O VSR **(Conclusão)**

VARIÁVEIS CLÍNICAS e LABORATORIAIS	MONOINFECÇÃO N= 48 (%)	COINFECÇÃO N= 22 (%)	TOTAL N= 70 (100%)	VALOR DE P
Necessidade de oxigênio				
Sim	47 (97,9%)	20 (90,9%)	67 (95,7%)	0,2307
Não	1 (2,1%)	2 (9,1%)	3 (4,3%)	
Necessidade de ventilação mecânica				
Sim	5 (10,4%)	3 (13,6%)	8 (11,4%)	0,6997
Não	43 (89,6%)	19 (86,4%)	62 (88,6%)	
Nº de dias de uso de oxigênio				
Mediana	4,5	5	5	0,6894
IQR*	(3 ; 6)	(3,3 ; 7,8)	(3 ; 7)	
Febre				
Sim	31 (64,6%)	20 (90,9%)	51 (72,9%)	0,0232
Não	17 (35,4%)	2 (9,1%)	19 (27,1%)	
Esforço respiratório				
Sim	41 (85,4%)	22 (100%)	63 (90,0%)	0,2612
Não	7 (14,6%)	0	7 (10,0%)	
Valor da proteína C reativa (mg/dL)				
Mediana	0,71	1,02	0,84	0,0970
IQR	(<0,33 ; 2,0)	(0,6 ; 2,8)	(<0,33 ; 2,21)	
NI*	14 (29,2%)	5 (22,7%)	19 (27,1%)	
Nº total de leucócitos ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)				
Mediana	9.375	13.155	10.315	0,0871
IQR*	(7.265 ; 13.387,5)	(9.460 ; 15.645)	(7.973 ; 14.598)	
Uso de antibiótico				
Sim	25 (52,1%)	15 (68,2%)	40 (57,1%)	0,2986
Não	23 (47,9%)	7 (31,8%)	30 (42,9%)	
Evolução Clínica				
Alta hospitalar	48 (100%)	21 (95,5%)	69 (98,6%)	NA*
Óbito	0	1 (4,5%)	1 (1,4%)	
Doença Grave				
Sim	7 (14,6%)	5 (22,7%)	12 (17,1%)	0,4978
Não	41 (85,4%)	17 (77,3%)	58 (82,9%)	

LEGENDA: **IQR**= intervalo interquartil; **NA**= não aplicável; **NI**= não informado; **UTI**= unidade de terapia intensiva.

FONTE: A autora (2015).

6.6 COMPARAÇÕES ENTRE AMOSTRAS COM INSERÇÃO E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS

Foram avaliadas as características clínicas e demográficas dos pacientes infectados pelo VSR que tinham ou não a inserção de nucleotídeos na segunda região variável do gene G. Essa inserção refere-se tanto ao grupo A do VSR quanto ao grupo B, visto que há relatos de inserções de 60 nucleotídeos em amostras do grupo B e de 72 nucleotídeos para o grupo A. Para essa comparação, o total de amostras analisadas foi de 68, pois duas sequências não puderam ser alinhadas com as outras, sendo então, excluídas das análises filogenéticas. Observou-se que houve uma diferença significativa entre a distribuição dos casos de pacientes sem DPOC e a presença de inserção de nucleotídeos, assim como presença de monoinfecção e não possuir inserção na sequência de nucleotídeos. Uma maior frequência de doença grave foi observada nas amostras com inserção e houve diferença significativa nos valores de proteína C reativa, que estavam dentro da normalidade nas amostras sem inserção, porém em 46,1% dos pacientes essa informação não pode ser avaliada (TABELAS 7 e 8).

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS (Continua)

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	COM INSERÇÃO N= 42 (%)	SEM INSERÇÃO N= 26 (%)	TOTAL N= 68 (100%)	VALOR DE P
Gênero				
Masculino	18 (42,9%)	14 (53,8%)	32 (47,1%)	0,4566
Feminino	24 (57,1%)	12 (46,2%)	36 (52,9%)	
Idade (em meses)				
Mediana	7	4	6	0,3555
IQR*	(3 ; 11)	(2 ; 11,5)	(2 ; 11)	
Idade gestacional (em semanas)				
≥ 37	35 (83,3%)	17 (65,4%)	52 (76,5%)	0,1574
< 37	7 (16,7%)	9 (34,6%)	16 (23,5%)	
Histórico familiar de asma				
Sim	12 (28,6%)	5 (19,2%)	17 (25,0%)	0,5654
Não	30 (71,4%)	21 (80,8%)	51 (75,0%)	
História pessoal de atopia				
Sim	12 (28,6%)	5 (19,2%)	16 (23,5%)	0,5654
Não	30 (71,4%)	21 (80,8%)	52 (76,5%)	
Presença de DPOC*				
Sim	3 (7,1%)	8 (30,8%)	11 (16,2%)	0,0164
Não	39 (92,9%)	18 (69,2%)	57 (83,8%)	

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS (**Conclusão**)

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	COM INSERÇÃO N= 42 (%)	SEM INSERÇÃO N= 26 (%)	TOTAL N= 68 (100%)	VALOR DE P
Nº de internamentos prévios por quadro respiratório				
Nenhum	29 (69,0%)	22 (84,6%)	51 (75,0%)	NA*
≥ 1	11 (26,2%)	4 (15,4%)	15 (22,1%)	
NI*	2 (4,8%)	0	2 (2,9%)	
Tabagismo Passivo				
Sim	14 (33,3%)	12 (46,2%)	26 (38,2%)	0,4286
Não	24 (57,2%)	12 (46,2%)	36 (53,0%)	
NI*	4 (9,5%)	2 (7,6%)	6 (8,8%)	

LEGENDA: *DPOC= Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; IQR= intervalo interquartil; NA= não aplicável; NI=não informado.

FONTE: A autora (2015).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO (**Continua**)

VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS	COM INSERÇÃO N= 42 (%)	SEM INSERÇÃO N= 26 (%)	TOTAL N= 68 (100%)	VALOR DE P
Local de internação				
Enfermaria	35 (83,3%)	25 (96,2%)	60 (88,2%)	0,1416
UTI*	7 (16,7%)	1 (3,8%)	8 (11,8%)	
Diagnóstico				
Bronquiolite	18 (42,9%)	8 (30,8%)	26 (38,3%)	NA*
Traqueobronquite	9 (21,4%)	10 (38,5%)	19 (27,9%)	
Pneumonia viral	8 (19,0%)	3 (11,5%)	11 (16,2%)	
Pneumonia bacteriana	4 (9,5%)	3 (11,5%)	7 (10,3%)	
Laringite	1 (2,4%)	2 (7,7%)	3 (4,4%)	
Apneia	2 (4,8%)	0	2 (2,9%)	
Tipo de infecção				
Monoinfecção	23 (54,8%)	23 (88,5%)	46 (67,6%)	0,0068
Coinfecção	19 (45,2%)	3 (11,5%)	22 (32,4%)	
Tempo de internamento (em dias)				
Mediana	5	5	5	0,4961
IQR*	(3,3 ; 7)	(4 ; 8)	(4 ; 8)	
Necessidade de oxigênio				
Sim	39 (92,9%)	26(100%)	65 (95,6%)	1,000
Não	3 (7,1%)	0	3 (4,4%)	
Necessidade de ventilação mecânica				
Sim	6 (14,3%)	1 (3,8%)	7 (10,3%)	0,2376
Não	36 (85,7%)	25 (96,2%)	61 (89,7%)	
Nº de dias de uso de oxigênio				
Mediana	5	4	5	0,8142
IQR*	(2,3 - 6)	(3 - 7)	(3 - 7)	

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NAS AMOSTRAS DE VSR COM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO GENE G E SEM INSERÇÃO (**Conclusão**)

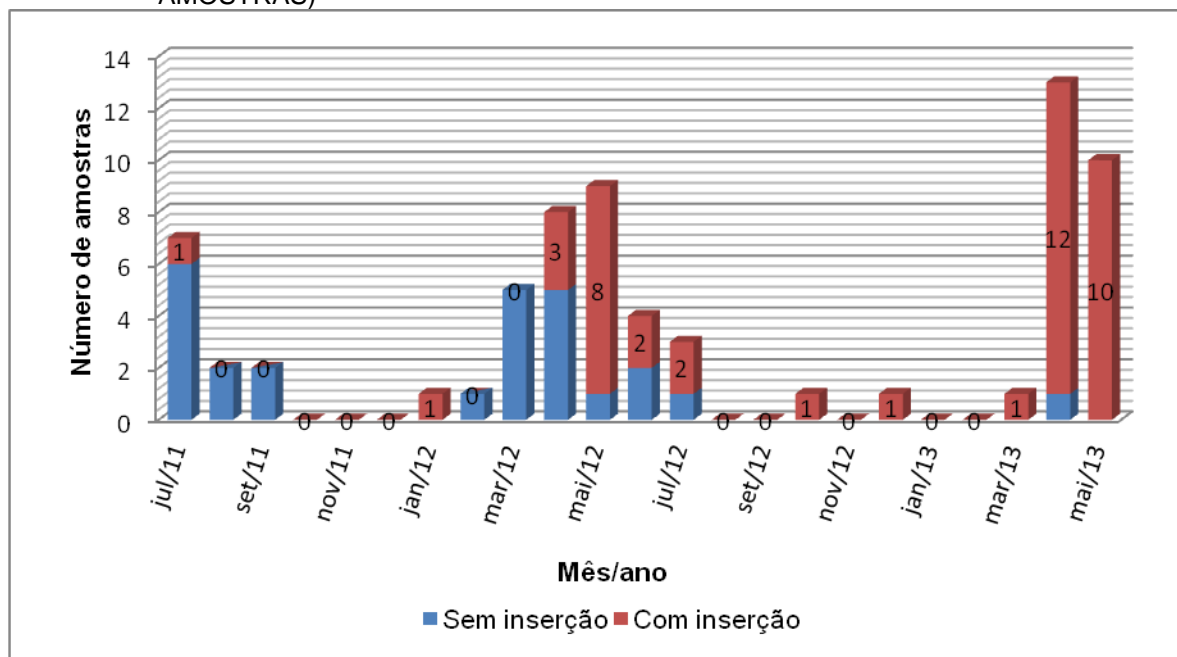
VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS	COM INSERÇÃO N= 42 (%)	SEM INSERÇÃO N= 26 (%)	TOTAL N= 68 (100%)	VALOR DE P
Febre				
Sim	35 (83,3%)	16 (61,5%)	51 (75,0%)	0,0817
Não	7 (16,7%)	10 (38,5%)	17 (25,0%)	
Esforço respiratório				
Sim	40 (95,2%)	21 (80,8%)	61 (89,7%)	0,0969
Não	2 (4,8%)	5 (19,2%)	7 (10,3%)	
Valor da proteína C reativa (mg/dL)				
Mediana	1,06	0,38	0,84	<0,0001
IQR*	(0,56 ; 2,6)	(<0,33 ; 1,47)	(<0,33 ; 2,21)	
NI*	7 (16,7%)	12 (46,1%)	19 (27,9%)	
Nº total de leucócitos (.10³/µL)				
Mediana	10.085	10.090	10.315	0,8499
IQR*	(8085,0; 14212,5)	(7582,5; 16.035)	(7.973 ; 14.598)	
Uso de antibiótico				
Sim	26 (61,9%)	13 (50,0%)	39 (57,4%)	0,4498
Não	16 (38,1%)	13 (50,0%)	29 (42,6%)	
Evolução clínica				
Alta hospitalar	41 (97,6%)	26 (100%)	1 (1,5%)	1,000
Óbito	1 (2,4%)	0	67 (98,5%)	
Doença grave				
Sim	14 (33,3%)	2 (7,7%)	16 (23,5%)	0,0188
Não	28 (66,7%)	24 (92,3%)	52 (76,5%)	

LEGENDA: **IQR**= intervalo interquartil; **NA**= não aplicável; **NI**= não informado; **UTI**= unidade de terapia intensiva.

FONTE: A autora (2015).

Em relação à distribuição das infecções por VSR durante os 22 meses de estudo, considerando as amostras com inserção de nucleotídeos e aquelas sem a inserção, pode-se observar que com o decorrer do tempo as amostras que possuem esse genótipo variante, com a inserção de nucleotídeos, começam a aumentar, chegando ao ponto de que no ano de 2013 apenas uma amostra não pertencia a esse novo genótipo (FIGURA 14).

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DAS INFECÇÕES POR VSR COM E SEM INSERÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO PERÍODO DE JULHO DE 2011 A MAIO DE 2013 (N= 68 AMOSTRAS)



FONTE: A autora (2015).

6.7 RT-PCR CONVENCIONAL *DUPLEX* PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS **G** E **F** E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Um total de 68 amostras positivas no estudo foram sequenciadas, sendo 53 classificadas como VSR do grupo A e 15 do grupo B. Essas 68 amostras foram utilizadas para a realização das análises.

6.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A definição dos genótipos do VSR é realizada pelo alinhamento dos 270 nucleotídeos da segunda porção variável do gene da proteína G, desta forma, realizou-se o alinhamento desta região, entre as amostras sequenciadas comparando com sequências nucleotídicas de diferentes genótipos de VSR depositadas no *GenBank* (QUADROS 9 e 10).

Na árvore filogenética apresentada (FIGURA 15) é possível observar as relações filogenéticas entre as sequências obtidas comparadas com as referências de distintos genótipos do VSR do grupo A. O resultado da análise filogenética evidenciou a circulação dos genótipos: **ON1**, **NA1**, **NA2** e **GA5**.

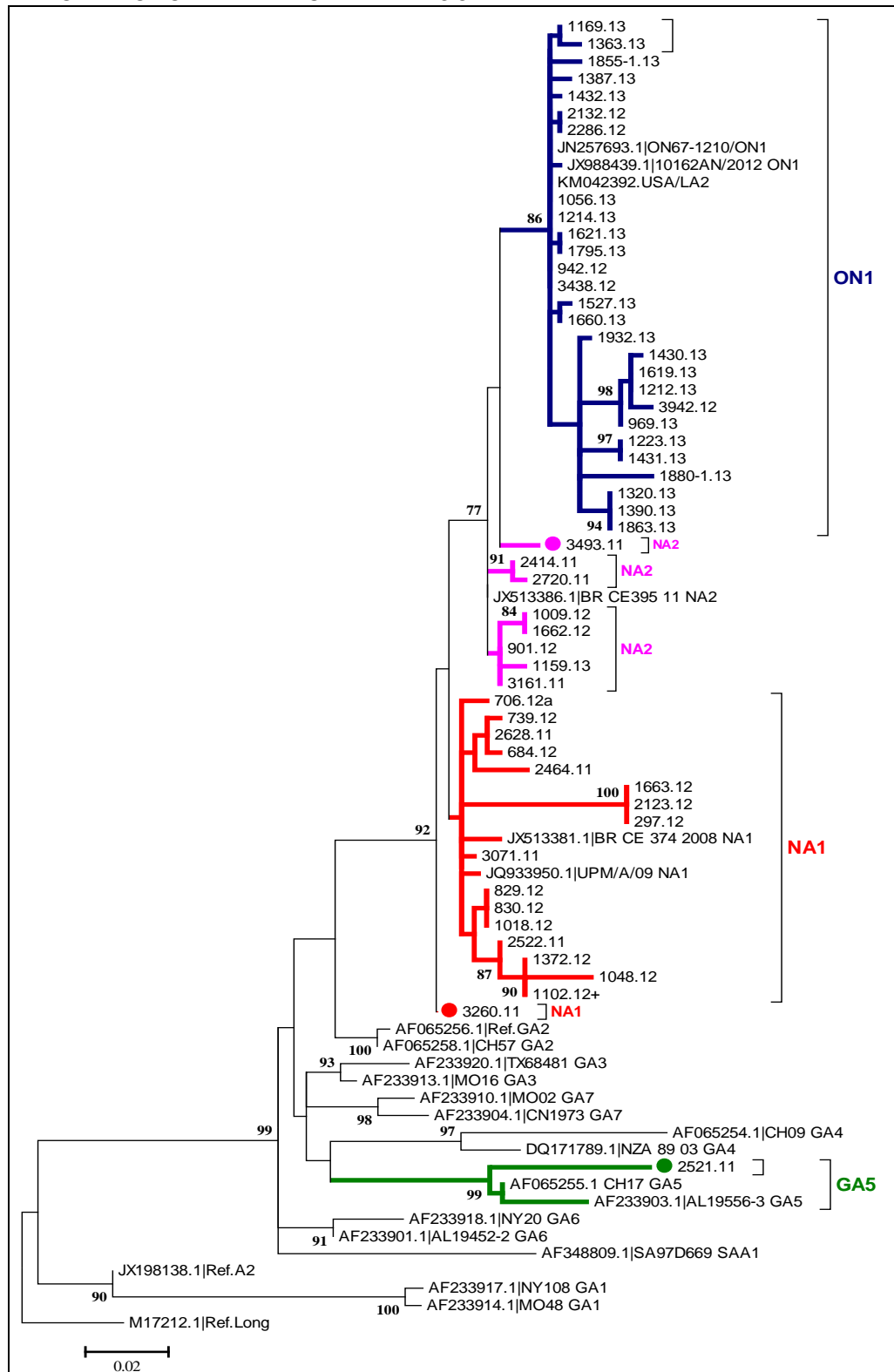
Na árvore filogenética representada na FIGURA 16, observa-se que as amostras do grupo B foram incluídas nos genótipos **BA-like**, não obtendo valores de *bootstrap* suficiente para suportar alguma diferenciação entre os diferentes genótipos BA.

Em 2011, das 11 amostras estudadas, 10 pertenciam ao grupo A e uma ao grupo B. Os genótipos encontrados para o grupo A foram **NA1** e **NA2** e apenas uma amostra (2521.11) agrupou-se ao genótipo **GA5**. A amostra do grupo B encontrou-se agrupada ao genótipo BA, sendo considerada **BA-like**.

Em 2012, 20 amostras eram do grupo A e 13 do grupo B, apresentando perfil de variabilidade parecido com o do ano anterior, porém um novo genótipo do grupo A, **ON1**, começou a circular. Os genótipos observados para o grupo A foram **NA1**, **NA2** e **ON1**. Em relação ao grupo B, todas as amostras foram semelhantes ao genótipo **BA-like**.

No ano de 2013, foram analisadas 23 amostras do grupo A e apenas uma do grupo B. Pode-se observar que em relação ao grupo A, apenas dois genótipos estavam presentes, **ON1** e **NA2**, sendo que apenas uma amostra (1159.13) estava relacionada ao genótipo **NA2**. A amostra do grupo B também foi considerada **BA-like**.

FIGURA 15 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM AMOSTRAS DO VSR GRUPO A (GENE G) USANDO O MÉTODO DE *MAXIMUM LIKELIHOOD*

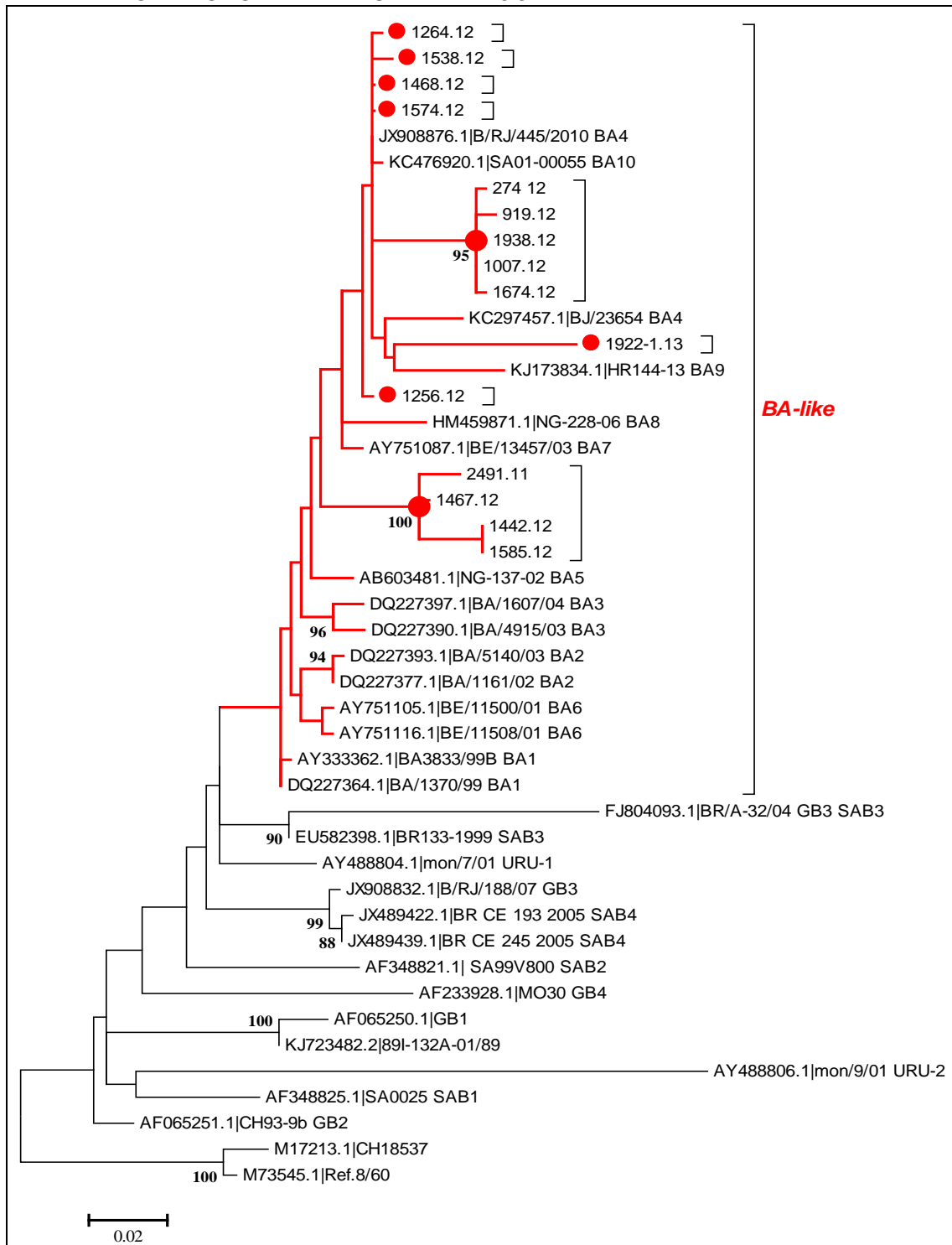


NOTA: Sequências referências foram obtidas do banco de dados *Genbank*. Números nos ramos referem-se aos valores de suporte *bootstrap* (somente valores acima de 75 são mostrados).

Barra - 0,02 substituição de nucleotídeo por sítio.

FONTE: A autora (2015).

FIGURA 16 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM AMOSTRAS DO VSR GRUPO B (GENE G) USANDO O MÉTODO DE *MAXIMUM LIKELIHOOD*.



NOTA: Sequências referências foram obtidas do banco de dados *Genbank*. Números nos ramos referem-se aos valores de suporte *bootstrap* (somente valores acima de 75 são mostrados). Barra - 0,02 substituição de nucleotídeo por sítio.

FONTE: A autora (2015).

7 DISCUSSÃO

A alta taxa de detecção do VSR entre as amostras analisadas pelo laboratório de virologia reflete a população atendida por esse hospital, que por ser classificado como um hospital terciário atende casos considerados mais graves. A maioria das unidades que encaminham amostras para esse laboratório pertence à pediatria ou aos cuidados relacionados com pacientes com doenças hematológicas, como a quimioterapia e o transplante de células tronco-hematopoéticas. Como o intuito era verificar a especificidade viral capaz de tornar o VSR mais adaptado para infectar crianças consideradas saudáveis, optou-se por selecionar as amostras que eram encaminhadas pelas unidades pediátricas e que não tivessem relação com aquelas com os cuidados hematológicos.

A detecção de VSR em 28% das amostras encaminhadas ao laboratório de virologia do HC – UFPR, demonstra taxas de incidência similares ao que foi observado em outros estudos de ITRI em pediatria, como no trabalho de Lamarão *et al.* (2012) em Belém – PA, que apresentou taxas de 23 a 61%, Silva (2014) que encontrou 33,4% de VSR entre as amostras estudadas em Curitiba – PR e Tsuchiya *et al.* (2005) na mesma região deste estudo, que relatou incidência de 19,3%. Já na cidade de São Paulo, dois estudos tiveram resultados diferentes com relação à incidência, Vieira *et al.* (2001) mostrou que a incidência deste vírus em crianças hospitalizadas com doença do trato respiratório inferior era de 41, 8% e Reis (2006) encontrou 11,3%, reforçando o que se conhece de que o padrão de circulação do VSR pode variar de região para região e de ano para ano e que ainda múltiplos genótipos podem co-circular durante um mesmo surto epidêmico (TAPIA *et al.*, 2014).

A população analisada apresentou padrões considerados por outros autores cujo trabalho tratava da descrição das particularidades desse vírus. A maioria das crianças pertencia ao grupo de lactentes menores de um ano, apresentando mediana de idade de 6 meses (IQR 2 ;11) em relação ao total de amostras, porém quando compara-se os pacientes acometidos pelo vírus pertencente ao grupo monoinfectado, percebe-se que essa mediana de idade fica menor, 4 meses (IQR 2 ; 9,3), talvez ligada à uma maior imaturidade do sistema imune em combater a infecção, facilitando a disseminação viral.

A alta frequência de crianças menores de um ano de idade (57/70, 81,4%) encontrada neste estudo concorda com o que é descrito sobre o VSR no trabalho de Cruz (1998), que cita que os picos de incidência da infecção acontecem entre o segundo e o sexto mês de idade, mostrando que 87% das crianças estudadas eram menores de um ano e 71,7% eram menores de 6 meses e com os dados relatados por Reis (2006), onde a maioria dos acometidos pelo vírus eram lactentes com idades entre 1 a 21 meses, com média de 6,4 meses e mediana de 5 meses. Igualmente foi reportado por Vieira *et al.* (2001) que todas as crianças afetadas pelo VSR eram menores de 3 anos de idade, sendo a maior parte de menores de um ano. Costa *et al.* (2009) em seu trabalho realizado em Portugal também encontrou uma mediana de quatro meses de idade, com 75% das crianças apresentando idade igual ou inferior a oito meses.

A maioria das crianças afetadas era do sexo feminino (54,3%) ao contrário do que foi relatado por Vieira *et al.* (2001) e por Costa *et al.* (2009), porém o sexo não foi identificado como um fator de risco significativo para a infecção por VSR nesse trabalho, embora quando compara-se o grupo de monoinfecção com o de coinfecção percebe-se diferença significativa entre os grupos, relacionando os casos de coinfecção viral com o sexo feminino ($p=0,0425$). Mesmo assim, alguns achados mostram um predomínio da infecção pelo VSR em crianças do sexo masculino, não relacionando o motivo dessa preferência (MARTINELLO *et al.*, 2002).

A maioria das crianças apresentou esforço respiratório (90%) e necessidade de oxigênio (95,7%), o que deve ter sido o motivo da indicação da internação. Além disso, ressalta-se que nessa faixa etária a doença tem características de maior gravidade, exigindo, portanto, a hospitalização com pronta e eficaz intervenção médica (LAMARÃO *et al.*, 2012).

Essa maior gravidade deve ser provavelmente uma consequência da primo-infecção que pode cursar com doença com maior atividade inflamatória, assim como ser decorrente de outros fatores, como calibre das vias aéreas reduzido, comum nos primeiros meses de vida, a ausência de ventilação colateral efetiva pelos poros de Kohn⁹ e a menor distensibilidade da caixa torácica que tornam grave a obstrução inflamatória que ocorre na bronquiolite (HOLMAN; SHAY; CURNS, 2003).

⁹ Poros de Kohn, são pequenos “orifícios” nas paredes entre dois alvéolos contíguos, auxiliando na comunicação alveolar. Fonte: ESSAwiki-BETA, 2015.

Da mesma forma, a maioria das crianças incluídas no estudo nasceu a termo (77,1%), ou seja, com mais de 37 semanas de gestação. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) crianças nascidas antes de 37 semanas completas de gestação (<259 dias), contadas a partir do primeiro dia do último período menstrual, são definidas como pré-termo (BRASIL, 2006).

Entre todas as amostras analisadas, observou-se que a maioria das crianças não apresentava os fatores de risco como prematuridade, histórico familiar de asma, história pessoal de atopia, internação prolongada e DPOC, previamente citados por Vieira (2009) e Faria (2012), os quais poderiam favorecer a sua contaminação pelo VSR. Já em relação à DPOC, houve diferença significativa entre a distribuição dos casos de pacientes sem DPOC e a presença de inserção na sequência de DNA ($p=0,0164$), mostrando que a contaminação não teve relação com um fator de risco, mas sim ao fato do vírus apresentar essa modificação na sequência de nucleotídeos, não sendo então reconhecido pelo sistema imune.

A maioria das crianças não tinha histórico de internamento prévio por quadros respiratórios (75,7%), concordando com os achados de Costa *et al.* (2009) onde 77,3% não havia referenciado episódios prévios de bronquiolite.

De acordo com Cruz (1998) parte das crianças hospitalizadas com ITRI apresenta melhora clínica após 3 – 4 dias, e a maioria recebe alta após 3 – 8 dias, corroborando com a mediana encontrada neste estudo, que foi de 5 dias (IQR 4 ; 8). O mesmo valor de mediana foi encontrado por Costa *et al.* (2009), onde 75% das crianças internadas permaneceram por um período igual ou inferior a 7 dias. Cruz (1998) também cita que a hospitalização prolongada tem sido associada à idade inferior a 6 semanas, necessidade de intubação, ventilação mecânica e presença de doenças cardíacas ou respiratórias de base.

O fato de não conseguir relacionar a maior predisposição à infecção pelo VSR nas crianças expostas ao tabagismo passivo, como já relatado por Vieira (2009) e Faria (2012), foi o fato de que muitas vezes não se encontrou essa informação no prontuário (8,6%). Ressalta-se que para estudos que buscam o perfil epidemiológico de uma determinada população atendida, dados que poderiam auxiliar na melhora dos programas de saúde na comunidade não são fornecidos muitas vezes por não serem questionados.

No presente estudo, o principal diagnóstico foi bronquiolite (38,6%), seguido por traqueobronquite (28,6%) e pneumonia viral (15,7%), concordando com os

achados de Popow-Kraupp e Aberle (2011) e Paris (2012) que dizem que durante a primeira infecção, 25 a 40% das crianças infectadas tiveram sinais e sintomas de bronquiolite e pneumonia. Vieira *et al.* (2001) também encontrou um predomínio de casos de bronquiolite e pneumonias focais, assim como Cruz (1998), que em seu estudo verificou que o VSR foi responsável por 71,4% das bronquiolites, 33,3% das broncopneumonias e 45% das traqueobronquites. Kim *et al.* (1973) também citam que as manifestações clínicas associadas ao VSR são dependentes da idade e que até o segundo ano de vida, predominam os quadros de bronquiolite e pneumonia, e com menor frequência a traqueobronquite e laringotraqueobronquite (KIM *et al.*, 1973).

A proteína C reativa é a principal proteína produzida na fase aguda da inflamação (COSTA *et al.*, 2009) e também pode ser utilizada pelos clínicos para auxiliar na diferenciação entre etiologias bacterianas e virais nos processos infecciosos. Costa *et al.* (2009) também cita que a proteína C reativa pode ser usada como um marcador de gravidade para os casos de bronquiolite.

De acordo com Lamarão (2012), utilizando níveis de Proteína C Reativa $\geq 1,87$ mg/dL, pode-se excluir infecções bacterianas graves de uma doença viral autolimitada em lactentes febris menores de três meses de idade. Assim, baixos níveis de Proteína C Reativa podem sugerir uma infecção viral e dependendo dos outros achados clínicos, permitem que o clínico tome a decisão de suspender o uso de antibióticos durante a internação, porém valores elevados também podem estar associados com doença invasiva e não necessariamente à etiologia bacteriana (COSTA *et al.*, 2009).

Neste estudo, a mediana dos valores da proteína C reativa foi de 0,84 mg/dL (IQR 0,33 ; 2,21), porém em aproximadamente 27% dos casos, esse exame não foi relatado no prontuário. Como não se conseguiu essa informação para todos os pacientes, algumas correlações ficaram prejudicadas, dando a entender que nos casos onde não houve a inserção dos fragmentos de nucleotídeos também não houve alteração dos valores da proteína C reativa, ficando com a mediana de 0,38 mg/dL (IQR 0,33 ; 1,47), considerada um valor dentro da normalidade para essa faixa etária. Porém, quando observamos que esse resultado não constava no prontuário de quase metade desses pacientes (46,2%), questiona-se que talvez esses valores não representem a realidade apresentada clinicamente por todos que tinham a infecção.

Em relação ao número de leucócitos, Costa *et al.* (2009) demonstram que a contagem leucocitária não tem utilidade demonstrada no diagnóstico ou como orientador do tratamento da bronquiolite, mesmo essa sendo considerada uma doença bastante prevalente entre as crianças, poucos dados existem relatando a eficácia e utilidade clínica de outros exames laboratoriais, como no caso da proteína C reativa. Neste trabalho, o número de leucócitos encontrado estava dentro dos parâmetros da normalidade, que segundo Ferreira *et al.* (2005) para crianças de 1 a 23 meses, são de 6000,0 a 14000,0.10³/μL leucócitos.

Observou-se também que 12,9% das crianças infectadas pelo VSR foram internadas em UTI e 95,7% necessitaram de oxigenoterapia, valores mais altos do que foi encontrado por Costa *et al.* (2009), onde 2,8% dos pacientes precisaram ser internados em UTI e 64,8% das crianças precisaram de oxigenoterapia para manter a saturação de oxigênio superiores a 92-95%.

De fato, os quadros clínicos mais graves, caracterizados por apneia ou insuficiência respiratória grave, as complicações e a mortalidade são mais frequentes em determinados grupos de risco e/ou devido a fatores de risco, quer demográficos, quer ambientais, que predispõe as crianças à infecção grave por VSR e consequente hospitalização (FARIA, 2012).

Segundo Sly e Jones (2011), em muitos lugares, crianças internadas com o quadro típico de bronquiolite viral aguda e que tenham VSR detectado em uma amostra respiratória não deveriam ser tratadas com antibiótico, no entanto, em algumas regiões, mesmo que se constate que o agente etiológico é um vírus, se esta criança apresentar outros fatores que podem estar associados com maior gravidade, como desnutrição ou comorbidades, onde o risco de coinfeção bacteriana é maior, a conduta recomendada seria de utilizar o antibiótico. Desta forma, nesse estudo o antibiótico foi utilizado em 57,1% das crianças, mostrando que muitas vezes, prevaleceu a conduta empírica e preventiva, já que crianças nessa faixa etária podem apresentar instabilidade nos dados vitais, podendo agravar seu quadro clínico em pouco tempo.

Percebe-se que é muito importante a coleta da amostra respiratória durante essas infecções e o rápido diagnóstico, a fim de restringir o uso de antibióticos para as crianças que realmente necessitem e para fornecer melhores terapias profiláticas.

Por outro lado, uma vez que a prescrição desenfreada de antibióticos para doenças de origem viral é um fator que contribui para o aumento da resistência aos

antibióticos de algumas bactérias prevalentes na população pediátrica, o diagnóstico viral rápido e preciso pode ser um importante componente de um plano de contenção das resistências microbianas (FARIA, 2012).

As taxas de codetecção viral relatadas em crianças pequenas variam de 14 a 44%, embora nem todos os estudos incluam o rinovírus. Na maioria dos estudos que testaram o rinovírus, esse é o segundo ou terceiro vírus mais frequente (SLY; JONES, 2011). Neste estudo houve 31,4% de coinfeção, concordando com o que foi dito anteriormente, porém o vírus mais frequente em conjunto com o VSR foi o rinovírus (54,5%), seguido pelo adenovírus (9,1%) e pelo parainfluenza do tipo 4 (9,1%). Paris (2012) relata que em pacientes pediátricos, a taxa de excreção viral é em maior quantidade e por um período mais longo do que em adultos, podendo explicar a presença de mais de um agente viral no exame diagnóstico. Assim, se houvesse a quantificação da carga viral contida na amostra, seria possível discriminar entre um vírus que realmente está causando a doença respiratória aguda e aqueles vírus que foram detectados simultaneamente, porém não apresentam relação causal com os sintomas clínicos reais (POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011), seguindo essa mesma ideia, Sly e Jones (2011) citam que o rinovírus pode infectar o epitélio brônquico e pode permanecer nas vias aéreas de crianças após a resolução dos sintomas clínicos agudos, explicando, em partes, a sua alta detecção.

Alguns estudos relatam que o rinovírus é responsável por casos de rinite infecciosa comum (trato respiratório superior), está associado com exacerbações da asma e com doença aguda do trato respiratório inferior, designadamente pneumonia, de modo especial em pessoas com DPOC, fibrose cística e imunocomprometidos (KESSON, 2007; PAULA *et al.*, 2011). Outros autores também sugerem que os rinovírus estão implicados em coinfeções do sistema respiratório, resultando numa maior gravidade das manifestações clínicas (PAULA *et al.*, 2011). Em relação ao adenovírus, Costa *et al.* (2009) citam que ele está associado a uma resposta inflamatória intensa, podendo mimetizar os parâmetros de uma infecção bacteriana, verificando-se também que induz a elevação nos valores da proteína C reativa durante a infecção, podendo justificar o fato de alguns clínicos recomendarem o uso do antibiótico durante o tratamento.

Neste estudo também se observou que 33,3% dos pacientes apresentaram doença grave, ou seja, precisaram ser internados em UTI e/ou necessitaram de ventilação mecânica. A constatação da doença grave apresentou uma relação

estatisticamente significativa com a inserção de nucleotídeos ($p=0,0188$), podendo ser explicada pela modificação que essa inserção ocasionou na proteína G que é a responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira, facilitando assim, a sua fuga do sistema imune e consequente infecção.

Embora a variação antigênica não seja essencial para a ocorrência de reinfecções, pode contribuir para que isso aconteça, uma vez que permite a evasão imune. Sabe-se que uma infecção primária apenas fornece uma proteção parcial para infecções subsequentes, pois é de curta duração, sendo comuns as reinfecções ao longo da vida, mesmo que a primeira tenha sido grave (FARIA, 2012).

Com relação à sazonalidade, neste estudo observou-se que a atividade do VRS ocorreu durante os meses de abril a julho, com pico no mês de maio (28% dos casos), concordando com o que foi encontrado por Tsuchiya *et al.* (2005) na mesma cidade (Curitiba, Paraná). Vieira *et al.* (2001) e Reis (2006), na cidade de São Paulo, obtiveram resultados semelhantes, o que é caracteristicamente encontrado em outras regiões subtropicais, que descrevem picos de incidência das infecções por VSR de maio a junho, mostrando uma sazonalidade relacionada ao outono-inverno, ligando a circulação viral aos meses com baixas temperaturas nesta região. Porém, sabe-se que em outras localidades brasileiras a ocorrência do VSR não é uniforme, como no caso da região norte, onde o pico de incidência acontece de abril a junho, coincidindo com o período de chuvas na região (LAMARÃO *et al.*, 2012). Como citado anteriormente, as epidemias duram cerca de cinco meses, atingindo o pico geralmente na metade do surto, quando são registradas 40% do total de infecções (SALES, 2009).

Neste estudo, os genótipos encontrados para o grupo A foram: **ON1**, **NA1**, **NA2** e **GA5**, concordando com o que foi descrito por TAPIA *et al.* (2014) que citam que os genótipos predominantes eram o GA2 e GA5 em muitos países nos últimos anos e com Machado (2012), que evidenciou a circulação dos genótipos: GA2 e GA5 entre as amostras analisadas. Dados um pouco diferentes foram encontrados na cidade de Salvador, onde houve a presença dos genótipos GA2, GA5 e GA7 (MOURA *et al.*, 2004; BOTOSSO *et al.*, 2009).

O genótipo ON1 já foi encontrado em diversas partes do mundo como Coréia do Sul, Itália, Alemanha e África do Sul indicando a sua rápida disseminação global, ressaltando a importância do trabalho de vigilância na investigação dos motivos que fazem com que esse genótipo tenha a capacidade de causar epidemias e vir a

tornar-se o genótipo predominante entre o grupo de VSR do grupo A ao redor do mundo (CUI *et al.*, 2013). Ballalai (2015) cita que entre 2013 e 2014 estavam circulando amostras representantes dos genótipos ON1, NA1 e NA2, concordando com o que também foi observado entre as amostras analisadas.

Nos estudos filogenéticos realizados, observa-se que as amostras do grupo B foram incluídas nos genótipos **BA-like**, não obtendo valores de *bootstrap* suficiente para suportar alguma diferenciação entre os diferentes genótipos BA. Cui *et al.* (2013) e Tapia *et al.* (2014) citam que este novo genótipo BA espalhou-se rapidamente por diversos países, sendo considerado o genótipo mais prevalente do grupo B a partir de 2005. No estudo realizado por Moura *et al.* (2013) também houve o predomínio do genótipo **BA-like**, confirmando os dados achados por esse trabalho. Por outro lado, em Salvador houve a presença de SAB3 e GB3 (subgrupo B) circulantes no Brasil (MOURA *et al.*, 2004; BOTOSSO *et al.*, 2009). Ballalai (2015) também se refere à presença dos genótipos BA9 e BA10 entre as amostras circulantes no Brasil.

Em relação aos genótipos encontrados, TAPIA *et al.* (2014) relatam que mesmo apresentando um incremento no número de nucleotídeos no gene G, tanto do grupo A, representado pelo genótipo ON1 (adição de 72 nucleotídeos), quanto do grupo B, o genótipo BA (adição de 60 nucleotídeos), não têm sido associados com diferentes perfis de virulência, apesar da grande mudança ocorrida no fragmento distal do gene G. Também ressaltam que ainda não houve uma associação bem estabelecida entre gravidade da doença e genótipo do VSR. Por outro lado, este estudo observou diferença significativa entre a presença da inserção e o aumento da gravidade.

É necessário salientar que o presente estudo inclui uma amostra reduzida de pacientes, o que limita também os seus resultados e diminui seu poder estatístico.

Consequentemente, essas limitações metodológicas permitem apenas levantar a hipótese da existência de uma relação entre a inserção nas sequências de nucleotídeos e a gravidade clínica.

Esta hipótese poderá ser melhor explorada com a realização de um estudo prospectivo, com critérios clínicos e dados do prontuário médico uniformes e com mais parâmetros indiretos de gravidade como outros marcadores inflamatórios.

8 CONCLUSÕES

- A utilização da metodologia de Taguchi auxiliou na otimização dos parâmetros ideais para serem utilizados na reação de RT-PCR convencional para amplificação dos genes que codificam as proteínas G e F do VSR;
- As amostras clínicas que continham inserção de nucleotídeos tanto do grupo A quanto do grupo B, tiveram diferença significativa no aumento de doença grave;
- Não houve diferença em relação aos genótipos das amostras com mono e coinfeção;
- Durante os anos de estudo, na população avaliada, os genótipos circulantes para o grupo A foram **GA5**, **NA1**, **NA2** e **ON1**. Em relação ao grupo B, todas as amostras foram relacionadas com o genótipo **BA-like**.
- Os genótipos descritos estão relacionados na literatura brasileira, que comenta que entre os anos de 2013 a 2014, havia relatos dos genótipos ON1, NA1 e NA2 do grupo A, e BA9 e BA10 para o grupo B. Também houve referência ao genótipo *BA-like* em 2014, assim como em 2011 foi citado que havia a presença do genótipo GA5 para o grupo A.

9 PERSPECTIVAS

Esta pesquisa complementa estudos prévios realizados por este grupo que busca avaliar o impacto da infecção pelo VSR na população pediátrica atendida no HC-UFPR, buscando uma maior compreensão das características virais que influenciam na frequência e virulência da infecção por VSR. Pretende-se estender esta pesquisa avaliando o impacto que estas novas variantes exercem nos pacientes imunodeprimidos internados neste hospital.

Enquanto a detecção de patógenos por métodos moleculares permite um formidável avanço no entendimento da epidemiologia da IRA em crianças, a interpretação de seus resultados apresenta algumas limitações, principalmente com relação à interpretação do impacto da codetecção viral. É possível que o emprego de técnicas quantitativas de biologia molecular permita uma melhor avaliação do papel destas codetecções na indução da resposta imunológica e sintomatologia respiratória. Ao se estabelecer a carga viral presente na amostra respiratória, o emprego do PCR quantitativo poderia, em tese, contribuir para identificar casos em que há alta replicação viral em fase aguda de agente responsável pelos sintomas ou para relativizar o achado de quantidades residuais de DNA ou RNA presentes na amostra. Investigações futuras sobre carga viral, polimorfismos genéticos do hospedeiro e epigenética poderão esclarecer a importância dos diferentes patógenos virais na gravidade da doença de crianças com IRA.

REFERÊNCIAS

A METODOLOGIA de Taguchi. Disponível em:

<<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/Taguchi.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

ABERLE, J. H. *et al.* Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, n. 7, p. 605-10, Jul 2005. ISSN 0891-3668. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999001>>. Acesso em 10 fev. 2015.

ALLANDER, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n. 43, oct. 25, p. 15712, 2005.

ALLANDER, T. *et al.* Identification of a third human polyomavirus. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 4130-6, Apr 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287263>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

ANDERSON, L. J. *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J Infect Dis**, v. 151, n. 4, p. 626-33, 1985.

ARBIZA, J. *et al.* Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. **J Clin Virol**, v. 35, n. 1, p. 41-5, 2006.

BALLALAI, Isabella (Rio de Janeiro). Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIIm). (Org.). **ATUALIZAÇÃO EM VÍRUS RESPIRATÓRIOS: Impacto e diagnóstico das doenças respiratórias virais no Brasil e no Mundo**. 2015. Disponível em: <<http://virusrespiratorios.com.br/palestra/W112Y7/mdulo-1-impacto-e-diagnostico-das-doencas-respiratorias-virais-no-brasil-e-no-mundo>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

BOTOSSO, V. F. *et al.* Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. e1000254, Jan 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19119418>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada. Brasília-DF, 2006.

BUTTON, Sérgio T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. 88 p. Universidade Estadual de Campinas – Programa de pós-graduação em Engenharia Mecânica. Campinas, 2012. Disponível em:<<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

CALVO, C. *et al.* Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. **J Clin Virol**, v. 42, n. 3, p. 268-72, Jul 2008. ISSN 1386-6532. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18455958>>.

CANDEIAS, J. A. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 9, n. 1, p.27-30, 1967.

CANDUCCI, F. *et al.* Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. **J Med Virol**, v. 80, n. 4, p. 716-23, Apr 2008. ISSN 0146-6615. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297694>>.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev Med Virol**, v. 11, n. 2, p. 103-16, 2001.

CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infantis with respiratory illness of virus related to Chimpanzee Coryza Agent (CCA). Epidemiological aspects of infection in infants and young children. **Am J Hyg**. v. 66, p.291-300. 1957a.

CHANOCK, R. M.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infantis with respiratory illness of virus related to chimpanzee coryza agent isolation, proteties and characterization. **Am J Hyg**. v. 66, p.281-90. 1957b.

CHANOCK, Robert. M. *et al.*, IV. Respiratory syncytial virus. **Am J Public Health**. v. 52, n. 6. June, 1962. p. 918 – 925.

CILLA, G. *et al.* Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. **J Med Virol**, v. 80, n. 10, p. 1843-9, Oct 2008. ISSN 1096-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712820>>.

COATES, H. V.; KENDRICK, L.; CHANOCK, R. M. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus of respiratory syncytial virus. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 112, p. 958-64. 1963.

COATES, H. V.; ALLING, D. W.; CHANOCK, R. M. An Antigenic Analysis of Respiratory Syncytial by Plaque Reduction Neutralization Test. **Am J Epidemiol**. v. 83, p. 299-313. 1966.

COBB, B. D.; CLARKSON, J. M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 18, p. 3801-5, Sep 1994. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937094>>.

COLLINS, P. L.; CROWE JÚNIOR. **Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus**. In: FIELDS Virology. 5.ed. Editors: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. 2007. p.1601-1646.

COSTA, S. *et al.* C Reactive protein and disease severity in bronchiolitis. **Rev Port Pneumol**, v. 15, n. 1, p. 55-65, 2009 Jan-Feb 2009. ISSN 0873-2159. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145387>>. Acesso 28 ago. 2015.

COYLE, P. V. *et al.* A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. **BMC Microbiol**, n. 4, p. 41, oct. 25, 2004.

CRUZ, C. R. **Vírus respiratório sincicial em lactentes internados com infecção aguda do trato respiratório inferior**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

CUI, G. *et al.* Emerging human respiratory syncytial virus genotype ON1 found in infants with pneumonia in Beijing, China. **Emerg Microbes and Infections**, v. 2, e22, 2013. DOI: 10.138/emi.2013.19.

DE PAULIS, M. *et al.* Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 4, p. 307-13, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1678-4782. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655684>>. Acesso em 8 ago. 2015.

DREYFUSS, J. L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An. Acad. Bras. Ciênc.** [online], v. 81, n. 3, p. 409-429, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652009000300007>. Acesso em: 28 jul. 2015.

ELANGO, N. *et al.* Resistance to human respiratory syncytial virus (VSR) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the VSR G glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 1906-1910, 1986.

ENGLUND, J. A. **Respiratory Syncytial Virus - Epidemiology and vaccine development/immunization strategies: critical gaps**. 28 slides. Seattle Children's Hospital, University of Washington Fred Hutchinson Cancer Research Center: WHO RSV Meeting March 23-24, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/RSV_epidemiology_critical_gaps_Englund.pdf?ua=1>. Acesso em: 07 jul. 2015.

ESSAwiki-BETA, Poros de Khon in – **Parênquima e Circulação Alvéolo-Capilar: Parênquima Pulmonar**. Disponível em: <http://www.fisiotic.org/essawiki/index.php?title=Par%C3%AAnquima_e_Circula%C3%A7%C3%A3o_Alv%C3%A9olo%E2%80%93Capilar>. Acesso em: 30 ago. 2015.

Espécie-tipo in **DICIONÁRIO DA LÍNGUA PORTUGUESA** com Acordo Ortográfico [em linha]. Porto: Porto Editora, 2003-2015. Disponível em: <<http://www.infopedia.pt/dicionarios/lingua-portuguesa/esp%C3%A9cie-tipo>>. Acesso: 27 jul. 2015.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 3, p. 371-84, 2000.

FARIA, Simão P.G. de. **O papel dos vírus na infecção respiratória inferior da criança** – Experiência profissionalizante nas vertentes de investigação e farmácia comunitária. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade da Beira Interior, Covilhã: Outubro, 2012.

FERREIRA, José Paulo *et al.* **Pediatria: diagnóstico e tratamento**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GAGLIARDI, T. B. *et al.* Concurrent detection of other respiratory viruses in children shedding viable human respiratory syncytial virus. **J Med Virol**, v. 85, n. 10, p. 1852-9, Oct 2013. ISSN 1096-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861138> >.

GAYNOR, A.M. *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 5, p. e64, May 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17480120> >.

GIMENEZ, H. B.; CASH, P.; MELVIN, W. T. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparasion of different virus isolates. **J Gen Virol**, v. 65, p. 963-71, 1984.

GRAHAM, B. **RSV Vaccine History, Animal Models, and Assays**. WHO Consultation on RSV Vaccine Development. Vaccine Research Center National Institute of Allergy and Infectious Diseases National Institutes of Health 2015. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/WHO_RSV_vaccine_history_Graham.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2015.

HABCHI, Johnny; LONGHI, Sonia. **Investigating intrinsically disordered proteins in paramyxovirus nucleoproteins and phosphoproteins**: Molecular BioSystems Blog. 2011. DOI: 10.1039/C1MB05204G. Disponível em: <<http://blogs.rsc.org/mb/2011/10/>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; MCINTOSH, K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. **J Infect Dis** v. 160, n. 2, p. 185-90, Aug 1989. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2760479>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

HOLMAN RC, SHAY DK, CURNS AT. Risk factors for bronchiolitis-associated deaths among infants in the United States. **Pediatric Infectious Diseases Journal** 2003; 22:483:490

HOWLEY, Peter M. **Fields' virology**. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, c2007. 2 v., ill. ISBN 9780781760607. Disponível em: <[http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=00139921/5th_Edition/6&XPATh=PG\(0\)](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=00139921/5th_Edition/6&XPATh=PG(0))>. Acesso em: 17 jul. 2015.

HUANG, Y. T.; WERTZ, G. W. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. **J Virol**, v. 43, n.

1, p. 150-7, Jul 1982. ISSN 0022-538X. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6125602>>. Acesso em: 1 jul. 2015.

I.C.T,S.L. (INSTRUMENTACIÓN CIENTÍFICA TÉCNICA, S.L). **Sistema de documentación de geles E-BOX VX2**. Software E-Capt. Catálogo 2012 – Aparatos. Disponível em:
<<http://www.ictsl.net/productos/01d63694a80f7db0d/sistemadedocumentaciondegeleseboxvx2.html>>. Acesso em 1 junho 2015.

ICTV. Human **Respiratory Syncytial Virus**. ICTVdb – The Universal Virus Database. 2006.

KESSON, A. M. Respiratory virus infections. **Paediatr Respir Rev**, v. 8, n. 3, p. 240-8, Sep 2007. ISSN 1526-0542. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868922>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

KIM, H. W. *et al.* Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. **Am J Epidemiol**, v. 98, n. 3, p. 216-25, Sep 1973. ISSN 0002-9262. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355005>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

KURT, A. Swanson *et al.* Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. **Proc Nat Acad Sciences (PNAS)**, v.108, n. 23, June 7, 2011. p. 9619-24.

LAMARÃO, L. M. **Pesquisa epidemiológica e molecular do vírus sincicial respiratório humano (VSRH) em amostras de pacientes hospitalizados com pneumonia, na cidade de Belém**. 011. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011. Disponível em:
<http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/2873/1/Tese_PesquisaEpidemiologicaMolecular.pdf>. Acesso em: 01 maio 2015.

LAMARÃO, L.M. *et al.* Prevalence and clinical features of respiratory syncytial vírus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. **BMC Infect Dis**. 2012. V. 12. p. 119 . Disponível em:
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-12-119.pdf>>. Acesso em: 30 maio de 2015.

LAMBERT, P. C. *et al.* Estimating the cost-effectiveness of an intervention in a clinical trial when partial cost information is available: a Bayesian approach. **Health Econ.**, v. 17, n. 1, p. 67-81, 2008.

MACHADO, D.B.B. **Identificação e caracterização molecular do vírus sincicial respiratório humano em crianças com infecções respiratórias de 2006 a 2010**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2012.

MAHY, B.W.J. *et al.* **Virology Methods Manual**, 1996.

MARGUET, C. *et al.* In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4596, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240806>>.

MARTINELLO, R. A *et al.* KAHN, J.S. Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of illness. **J Infect Dis**. 2002. V. 186. p. 839 – 42. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/186/6/839.full.pdf+html>>. Acesso: 30 maio de 2015.

MILLICHAP, J. J.; WAINWRIGHT, M. S. Neurological complications of respiratory syncytial virus infection: case series and review of literature. **J Child Neurol**, v. 24, n. 12, p. 1499-503, Dec 2009. ISSN 1708-8283. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264736>>. Acesso em 07 jul. 2015.

MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Coryza. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.92, n. 3, p. 544-9. Jul. 1956. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/content/92/3/544.full.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

MOURA, F. E. *et al.* Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. **Influenza Other Respir Viruses**, v. 7, n. 6, p. 1128-35, Nov 2013. ISSN 1750-2659. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517375>>. Acesso em 15 maio 2015.

MUFSON, M.A. *et al.* Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol**, v. 66 (Pt 10), p. 2111-24, Oct 1985. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413163>>. Acesso em: 20 fev. de 2015.

MUFSON, M.A. *et al.* Subgroup Characteristics of Respiratory Syncytial Virus Strains Recovered from Children with Two Consecutive Infections. **J Clin Microbiol**. Aug.1987. v.25, n. 8. p. 1535 – 9. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269264/pdf/jcm00092-0207.pdf>>. Acesso em: 28 maio de 2015.

NAGAI, K. *et al.* Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. **J Med Virol**, v.74, n. 1. p. 161 – 5, Sep 2004. ISSN 0146-6615. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258983>>. Acesso em: 28 maio de 2015.

NASCIMENTO, C. A. **Detecção de Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo: 2006.

NASCIMENTO, M. S. *et al.* High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. **Clinics (São Paulo)**, v. 65, n. 11, p. 1133-7, 2010. ISSN 1980-5322. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243286>>.

NCBI (Comp.). **Human respiratory syncytial virus**: complete genome. 2014. NCBI Reference Sequence: NC_001781.1. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/9629198?report=graph>>. Acesso em: 20 set. 2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Reference sequence (RefSeq) – Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

NOLAN, T. *et al.* Prevalence and Incidence of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viral Infections in Children Aged 6 Months to 10 Years With Influenza-like Illness Enrolled in a Randomized Trial. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 11, p. e80-9, Jun 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673560>>. Acesso em: 16 ago. 2015.

NORRBY, E.; MARUSYK, H.; ORVELL, C. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). **J Virol**, v. 6, n. 2, p. 237-42, Aug 1970. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4100527>>. Acesso em: 1 jul. 2015.

OLIVEIRA, B.H de; MULLER, K.S.; MEDEIROS, I.D. **Expressão de genes biomarcadores em ostras *Crassostrea gigas* em relação ao sexo**. UNISUL – Laboratório de Biologia Molecular, SC. (2010). Disponível em: <http://www.rexlab.unisul.br/junic/2010/projeto/arquivos/poster2010_25_08_09__4c75140758825.pdf>. Acesso em: 1 junho 2015.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde (SESA). Nota Técnica Conjunta SESA nº 03/2015 – **Sistematização do fluxo para solicitação, distribuição, dispensação do medicamento Palivizumabe para o tratamento profilático do Vírus Sincicial Respiratório (VSR) no Estado do Paraná**. Curitiba, 2015.

PARIS, Fernanda de. **Epidemiologia dos vírus respiratórios e avaliação das características genéticas do vírus sincicial respiratório entre crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PAULA, N. T. *et al.* Human rhinovirus in the lower respiratory tract infections of young children and the possible involvement of a secondary respiratory viral agent. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 316-21, May 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655819>>.

PERDIGÃO, A.C.B. **Caracterização molecular dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza – Ceará durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004 – 2008)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza: 2009.

PERET, T. C. *et al.* Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. **J Gen Virol**, v. 79 (Pt 9), p. 2221-9, Sep 1998. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747732>>. Acesso em 10 jul. 2015.

PIEDIMONTE, G.; PEREZ, M.K. Respiratory Syncytial Virus Infection and Bronchiolitis. **Pediatr Rev.** v.35, n. 12. Dec. 2014. p. 519 -30.

POPOW-KRAUPP, T.; ABERLE, J. H. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. **Open Microbiol J**, v. 5, p. 128-34, 2011. ISSN 1874-2858. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262985>>.

QUAN, P. L. *et al.* Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2359-64, 2007.

RABONI, S. M. *et al.* Laboratory diagnosis, epidemiology, and clinical outcomes of pandemic influenza A and community respiratory viral infections in southern Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 1287-93, Apr 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248084>>. Acesso em 17 jul. 2015.

RAFIEFARD, F. *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. **Virus Res**, v. 105, n. 2, p. 137-45, Oct 2004. ISSN 0168-1702. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351487>>. Acesso em 17 jul. 2015.

RAMIREZ, J. B. *et al.* Human respiratory syncytial vírus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000 – 2011. **Rev Panam Salud Publica**, v. 36. n. 2. p. 101 – 9, 2014.

REIS, Alexandra Dias. **Incidência de doença de vias aéreas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano em coorte de recém nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas diagnósticas e caracterização molecular.** Tese de Doutorado em Ciências. São Paulo: 2006.

RICHARD, N. *et al.* The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 27, n. 3, p. 213-7, Mar 2008. ISSN 0891-3668. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18277932>>. Acesso em 17 jul. 2015.

SALES, Claudia T.P. de Moraes. **Deteção de quasispecies em amostras de vírus respiratório sincicial humano (HRSV) na ausência e na presença de soros policlonais.** Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo: 2009.

SEEGENE. **Detection of Respiratory Pathogens Influenza A/B virus typing7 Respiratory virus detection12 Respiratory virus detection15 Respiratory virus detection6 Respiratory bacteria detection** Seeplex. Disponível em: <<http://www.r-i-j.com/shiryou/RV60-EN120716B01.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

SHOBUGAWA, Y. *et al.* Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 8, p. 2475-82, Aug 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553576>>. Acesso em: 2 ago. 2015.

SILVA, Débora C.C e. **Incidência de infecções graves pelo vírus sincicial respiratório em crianças prematuras**. 132 f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Imunologia: Alergologia e Pneumologia Pediátrica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SIMABUCO, Fernando M. **Expressão das proteínas N e P do vírus respiratório sincicial humano: estudos funcionais e de imunização**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e Instituto Butantan, São Paulo, 2008.

SLY, P. D.; JONES, C. M. Viral co-detection in infants hospitalized with respiratory disease: is it important to detect. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 4, p. 277-80, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1678-4782. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21842109>>. Acesso em 17 ago. 2015.

STEMPEL, H. E. *et al.* Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. **Acta Paediatr**, v. 98, n. 1, p. 123-6, Jan 2009. ISSN 1651-2227. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785966>>. Acesso em 10 jul. 2015.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 1-15, table of contents, Jan 2000. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627488>>.

SURYADEVARA, M. *et al.* Viral etiology of acute febrile respiratory illnesses in hospitalized children younger than 24 months. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 50, n. 6, p. 513-7, Jun 2011. ISSN 1938-2707. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262758>>.

SYRMIS, M. W. *et al.* A sensitive, specific, and cost-effective *multiplex* reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. **J Mol Diagn**, v. 6, n. 2, p. 125-31, 2004.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 10, p. 2731-9, Oct 2011. ISSN 1537-1719. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

TAPIA, L. I. *et al.* Gene Sequence Variability of the Three Surface Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Texas. **PLoS ONE**, v.9, n. 3, e90786. March, 2014.

THOMAZELLI, Luciano M. **Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de genescan-RT-PCR**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

TOLEDO, José Carlos de; AZEKA, Fábio; AMARAL, Daniel Capaldo. **Projeto Robusto/ Método Taguchi**. 11 nov. 1999. Disponível em: <http://www.numa.org.br/conhecimentos/conhecimentos_port/pag_conhec/Projeto_robustov5.html>. Acesso em: 12 jul. 2014.

TRENTO, A. *et al.* Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. **J Gen Virol**, v. 84, n. Pt 11, p. 3115-20, Nov 2003. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573817>>. Acesso em 9 jul. 2015.

TRENTO, A. *et al.* Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. **J Virol**, v. 80, n. 2, p. 975-84, Jan 2006. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16378999>>. Acesso em 9 jul. 2015.

TSUCHIYA, L. R. *et al.* Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **J Infect**, v. 51, n. 5, p. 401-7, Dec 2005. ISSN 1532-2742. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321652>>. Acesso em 9 jul. 2015.

VALDÉS, O. *et al.* Unusual antigenic and genetic characteristics of human respiratory syncytial viruses isolated in Cuba. **J Virol**, v. 72, n. 9, p. 7589-92, Sep 1998. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696858>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

VAN DE POL, A. C. *et al.* Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the paediatric intensive care unit with lower respiratory tract infection. **Crit Care**, v. 10, n. 2, p. R61, 2006.

VENTER, M. *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **J Gen Virol**, v. 82, n. Pt 9, p. 2117-24, Sep 2001. ISSN 0022-1317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514720>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

VIEIRA, S. E. *et al.* Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125-31, 2001 May-Jun 2001. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452319>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

VIEIRA, Renata Amato. **Concentrações de mediadores inflamatórios em crianças com idade inferior a três meses e infecção do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório**. Tese (Doutorado em Ciências). São Paulo: 2009.

WALSH, E. E.; HALL, C. B. **Respiratory Syncytial Virus** (chapter 21). In Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 6 ed. American Public Health Association. Washington, 1989.

WARIS, M.; WHITE, L. J. Seasonality of respiratory syncytial virus infection. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 4, p. 541, Aug 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838247>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

WEBER, A.; WEBER, M.; MILLIGAN, P. Modeling epidemics caused by respiratory syncytial virus (RSV). **Math Biosci**, v. 172, n. 2, p. 95-113, Aug 2001. ISSN 0025-5564. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520501>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

WEBER, M. W.; MULHOLLAND, E. K.; GREENWOOD, B. M. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop Med Int Health**, v. 3, n. 4, p. 268-80, Apr 1998. ISSN 1360-2276. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9623927>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

WERTZ, G. W. *et al.* Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice. **J Virol**, v. 61, n. 2, p. 293-301, 1987.

ZLATEVA, K. T.; VAN RANST, M. Detection of subgroup B respiratory syncytial virus in the cerebrospinal fluid of a patient with respiratory syncytial virus pneumonia. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 11, p. 1065-6, Nov 2004. ISSN 0891-3668. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545869>>. Acesso em 07 jul. 2015.

ZLATEVA, K. T. *et al.* Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **J Virol**, v. 79, n. 14, p. 9157-67, Jul 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994810>>. Acesso em 07 jul. 2015.

ZLATEVA, K. T. *et al.* Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 3022-30, Sep 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609323>>. Acesso em 07 jul. 2015.

APÊNDICE 1 - PROTOCOLO DA RT-PCR *SEMI-NESTED* PARA VSR

DATA: _____ RT-PCR *semi-nested* RSV

ENZIMA: Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

Amostra:	PCR I (gp F e gpG)	PCR II (gp F e gpG)RSV	
REAGENTE	VOLUME	REAGENTE	VOLUME
Buffer (10x PCR)	5,0 µL	Buffer (10x PCR)	5,0 µL
MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL	MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL
dNTP's (10 mM)	1,0 µL	dNTP's (10 mM)	1,0 µL
GAB (+) (10pmol)	0,5 µL	GAB (+) (10pmol)	0,5 µL
F164 (-) (10pmol)	0,5 µL	F1 AB (-) (10pmol)	0,5 µL
Enzima Taq	0,25 µL	Enzima Taq	0,25 µL
H ₂ O qsp		H ₂ O qsp	38,25 µL
DNA	(52 ng/ µL)	DNA	3,0 µL (PCR I)
TOTAL REAÇÃO	50 µL	TOTAL REAÇÃO	50 µL

Amostra:	PCR I (gp F e gpG)	PCR II (gp F e gpG)RSV	
REAGENTE	VOLUME	REAGENTE	VOLUME
Buffer (10x PCR)	5,0 µL	Buffer (10x PCR)	5,0 µL
MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL	MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL
dNTP's (10 mM)	1,0 µL	dNTP's (10 mM)	1,0 µL
GAB (+) (10pmol)	0,5 µL	GAB (+) (10pmol)	0,5 µL
F164 (-) (10pmol)	0,5 µL	F1 AB (-) (10pmol)	0,5 µL
Enzima Taq	0,25 µL	Enzima Taq	0,25 µL
H ₂ O qsp		H ₂ O qsp	38,25 µL
DNA	(52 ng/ µL)	DNA	3,0 µL (PCR I)
TOTAL REAÇÃO	50 µL	TOTAL REAÇÃO	50 µL

Amostra:	PCR I (gp F e gpG)	PCR II (gp F e gpG)RSV	
REAGENTE	VOLUME	REAGENTE	VOLUME
Buffer (10x PCR)	5,0 µL	Buffer (10x PCR)	5,0 µL
MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL	MgCl ₂ (100 mM)	1,5 µL
dNTP's (10 mM)	1,0 µL	dNTP's (10 mM)	1,0 µL
GAB (+) (10pmol)	0,5 µL	GAB (+) (10pmol)	0,5 µL
F164 (-) (10pmol)	0,5 µL	F1 AB (-) (10pmol)	0,5 µL
Enzima Taq	0,25 µL	Enzima Taq	0,25 µL
H ₂ O qsp		H ₂ O qsp	38,25 µL
DNA	(52 ng/ µL)	DNA	3,0 µL (PCR I)
TOTAL REAÇÃO	50 µL	TOTAL REAÇÃO	50 µL

Programa do termociclador:

94 °C – 2 min.

94°C – 30seg.
 50°C – 30seg. } 35 ciclos
 72°C – 1 min.

4°C -- ∞

APÊNDICE 2 - DADOS CLÍNICOS ANALISADOS POR REVISÃO DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS INCLUÍDOS NO ESTUDO

Número do registro no Hospital de Clínicas

Número do registro no laboratório de virologia

Ano

VSR grupo

Genótipo

Inserção de nucleotídeos (SIM=0; NÃO=1)

Monoinfecção 0, Coinfecção 1

Mês

Internado em Enfermaria 0 UTI 1

Sexo (FEMININO=0; MASCULINO=1)

Idade Gestacional (SEMANAS)

Vírus (VSR 0, hMPV 1, PIV 2, HRV 3, AdV 4, FLU 5, EV 6, HBoV 7, HCoV 8)

Número de vírus

Diagnóstico (TQB 0; BQL 1; LARINGITE 3; PNM VIRAL 4; PNM BACT 5; APNEIA 6)

Idade (EM MESES)

Tempo de internamento (EM DIAS)

Óbito (SIM=0; NAO=1)

DPOC (SIM=0; NAO=1)

Ventilação mecânica (SIM=0; NAO=1)

Tabagismo passivo (SIM=0; NAO=1)

Proteína C reativa – valor

Necessidade de oxigênio (SIM=0; NAO=1)

Número de leucócitos no primeiro hemograma – valor

Número de dias de oxigênio – valor

Número de internamentos prévios por quadro respiratório – valor

História pessoal de atopia (SIM=0; NAO=1)

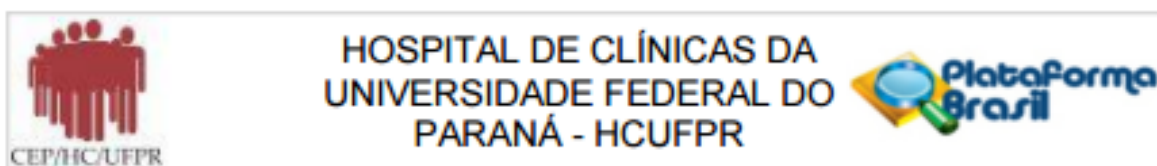
Febre (SIM=0; NAO=1)

Uso de antibiótico (SIM=0; NAO=1)

História familiar de asma (SIM=0; NAO=1)

Esforço respiratório (SIM=0; NAO=1)

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP-HC-UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Síndrome respiratória aguda grave: epidemiologia molecular das infecções respiratórias virais e vigilância da emergência de variantes resistentes aos antivirais

Pesquisador: Sônia Mara Raboni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18714013.4.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 366.696

Data da Relatoria: 20/08/2013

Apresentação do Projeto:

Já apresentado na versão 1.

Objetivo da Pesquisa:

Já apresentado na versão 1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já apresentada na versão 1.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já apresentados na versão 1.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já apresentadas na versão 1.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O ofício apresentado pela pesquisadora esclarece plenamente todas as dúvidas sobre o

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

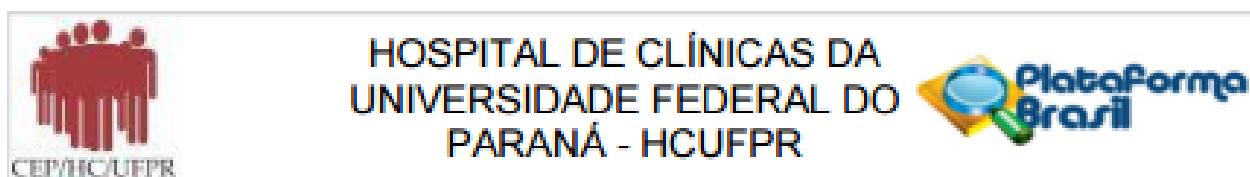
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 368.698

armazenamento e descarte das amostras.

Projeto e documentações apresentados de forma adequada.

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 21 de Agosto de 2013

Assinador por:
Renato Tambara Filho
 (Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2 – MEIO DE TRANSPORTE PARA VÍRUS RESPIRATÓRIOS**Tampão Fosfato Triptose com Gelatina 0,5%**

Triptose _____	2,95 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O _____	0,08 g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O _____	2,06 g
Gelatina _____	0,5 g
Vermelho de fenol 0,5% _____	0,4 mL
Água bidestilada _____	100 mL

FONTE: Mahy *et al* (1996)

**PRODUÇÃO ACADÊMICA 1 - RESUMO APRESENTADO NA 2ª MOSTRA ANUAL
DE PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS “CIÊNCIA NO
ESPELHO”**

Molecular characterization and clinical epidemiology of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in hospitalized children, Brazil

Moreira, F.B.; Rosário, C.S.; Pereira, L.A.; Nogueira, M.B.; Vidal, L.R.; Raboni, S.M.

Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas, Departamento de Patologia Básica, UFPR.

Email: cellifran@gmail.com

Background: Human respiratory syncytial virus (hRSV) is an important cause of acute respiratory infections. It is highly prevalent among children until two years old, and usually associated with bronchiolitis and pneumonia. The hRSV, a paramyxovirus class, has a single strand RNA with 10 genes, which codifies 11 proteins. An important factor that contributes to hRSV outbreaks is the surface proteins F and G, which are responsible for entry and dissemination of virus in the host cells. This study reports genetic variability, clinical and epidemiological profile of hRSV detected in pediatric patients hospitalized at a referral academic hospital, Southern Brazil. **Methods:** This cross-sectional study included pediatric patients attending from July 2011 to May 2013. Clinical, demographic, and epidemiological data were evaluated by review of medical records. hRSV positive samples were analyzed by conventional RT-PCR to amplify the G and F genes, and subtyping was carried out by nucleotide sequencing. **Results:** A total of 74 (65.5%) hRSV positive were analyzed, being 59 (79.8%) type A and 15 (20.2%) type B. Fifty-three (71.6%) of them were viral mono-infection, and 21 (28.4%) were co-infection. The median age was 5.8 month (IQR 1.7-12.0), and 54% were female. No co-morbidities was found among the study population. Fever, respiratory distress, oxygen therapy and antibiotic use were reported for the majority of patients, none needed intensive care, and no patient died. Up to the time were found two samples of type B with inserts of 60 nucleotides, correlating with the genotype BA and a sample of The group showing insertion of nucleotides, not related. **Conclusion:** It was not observed association between the presence of HRSV mono- or co-infection or viral genotype with disease severity. The data is an important role to guide the prioritization of research into novel antiviral therapies, and in the implementation of preventive measures to avoid the nosocomial spread of this pathogen.

Palavras-chave: *Human respiratory syncytial virus, molecular epidemiology, G glycoprotein, genetic variability.*

NOTA: Evento realizado de 24 a 25 de fevereiro de 2015; Curitiba, Paraná.

PRODUÇÃO ACADÊMICA 2 - RESUMO PUBLICADO: VIRUS REVIEWS AND RESEARCH – JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY

XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology
October, 11 - 14, 2015, Costão do Santinho Resort, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

175

Human Virology: HV

HV402 - MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CLINICAL EPIDEMIOLOGY OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (HRSV) IN HOSPITALIZED CHILDREN, BRAZIL

Moreira, F.B.; Rosario, C.S.; Pereira, L.A.; Nogueira, M.B.; Vidal, L.R.R.; Raboni, S.M.

1. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
2. HOSPITAL DE CLINICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Human respiratory syncytial virus (hRSV) is an important cause of acute respiratory infections. It is highly prevalent among children until two years old, and usually associated with bronchiolitis and pneumonia. The hRSV, a *paramyxovirus* virus, has a single strand RNA with 10 genes, which codifies 11 proteins. An important factor that contributes to hRSV outbreaks is the surface proteins F and G genetic variability, which are responsible for entry and dissemination of virus in the host cells. This study reports genetic variability, clinical and epidemiological profile of hRSV detected in pediatric patients hospitalized at a referral academic hospital, Southern Brazil. Methods: This cross-sectional study included samples from pediatric patients attending from July 2011 to May 2013. Clinical, demographic, and epidemiological data were evaluated by review of medical records. hRSV positive samples were analyzed by conventional RT-PCR to amplify the G and F genes, and subtyping was carried out by nucleotide sequencing. Results: A total of 70 hRSV positive were analyzed, being 55 (78.5%) type A and 15 (21.5%) type B. Forty-nine (70.0%) of them were viral mono-infection, and 21 (30.0%) were co-infection. The median age was 5.8 months (IQR 1.7-11.0), and 54% were female. Eleven patients had co-morbidities among the study population. Fever, respiratory distress, oxygen therapy and antibiotic use were reported for the majority of patients, nine children needed intensive care, and one patient died due to other factors unrelated to the respiratory condition. Up to the time were found twenty-eight samples of type A with inserts of 72 nucleotides, correlating with the genotype ON1 and at least three samples of The group B showing insertion of 60 nucleotides, related with the genotype BA. Conclusion: It was not observed association between the presence of HRSV mono- or co-infection or viral genotype with disease severity. The data is an important role to guide the prioritization of research into novel antiviral therapies, and in the implementation of preventive measures to avoid the nosocomial spread of this pathogen. Keywords: Human respiratory syncytial virus; molecular epidemiology; G glycoprotein; genetic variability. Financial Support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES).

October 2015 Volume 20 – Supplement 1 - Abstracts/Posters - Human Virology: HV

NOTA: O resumo foi publicado nos *Annals of the "XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology"*, realizado de 11 a 14 de outubro de 2015; Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.